

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE : 50

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de l'Université de Marseille

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri SARLES

DOCTEUR EN MÉDECINE

CHEF DE CLINIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

CHARGÉ DE RECHERCHES A L'INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

1^{re} Thèse : Étude cinétique de la phosphomonoestérase alcaline
des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie.

2^{me} Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 27 mars 1953, devant la Commission d'examen.

MM. P. DESNUELLE, *Président.*

P. BENOIT

E. CALVET

J. ROCHE

} *Examineurs.*

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1954



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE MARSEILLE

Nom du Candidat : SARLES

Prénom : Henri

Date de soutenance : 27 Mars 1953.

Numéro d'ordre : N° 50.

SARLES (Henri).

Etude cinétique de la phospho-monoestérase alcaline des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie. — *Marseille, 1954. M. Declume imprimeur, Lons-le-Saunier, in-8°, 116 pages, 8 figures.*

(Thèse de doctorat ès sciences naturelles, Marseille 1953, N° 50).

SARLES (Henri).

Etude cinétique de la phospho-monoestérase alcaline des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie. — *Marseille, 1954. M. Declume imprimeur, Lons-le-Saunier, in-8°, 116 pages, 8 figures.*

(Thèse de doctorat ès sciences naturelles, Marseille 1953, N° 50).

SARLES (Henri).

Etude cinétique de la phospho-monoestérase alcaline des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie. — *Marseille, 1954. M. Declume imprimeur, Lons-le-Saunier, in-8°, 116 pages, 8 figures.*

(Thèse de doctorat ès sciences naturelles, Marseille 1953, N° 50).

SARLES (Henri).

Etude cinétique de la phospho-monoestérase alcaline des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie. — *Marseille, 1954. M. Declume imprimeur, Lons-le-Saunier, in-8°, 116 pages, 8 figures.*

(Thèse de doctorat ès sciences naturelles, Marseille 1953, N° 50).

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

N° D'ORDRE : 50

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de l'Université de Marseille

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri SARLES

DOCTEUR EN MÉDECINE

CHEF DE CLINIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

CHARGÉ DE RECHERCHES A L'INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE

1^{re} Thèse : Étude cinétique de la phosphomonoestérase alcaline
des organes de mammifères. Origine et régulation de la phosphatasémie.

2^{me} Thèse : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 27 mars 1953, devant la Commission d'examen.

MM. P. DESNUELLE, *Président.*

P. BENOIT	} <i>Examineurs.</i>
E. CALVET	
J. ROCHE	

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1954



UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au champ d'honneur :

M. F. R. MARTY

Maître de conférences de Mathématiques
(14 juin 1940).

Doyen et Professeurs honoraires : MM. A. MARCHAUD, E. TRAYNARD.

Professeurs honoraires : MM. : M. CAULLERY, J. PERES, G. PETIT,
P. SEVE, J. BOSLER, M. KOLLMANN, R. THYRY, A. TIAN.

Maîtres de Conférences Honoraires : MM. H. BIMAR et D. RICARD.

Doyen : M. P. CHOUX.

Assesseur : M. P. HOUARD.

Secrétaire Principal : M. H. LANFRANCHI.

Professeurs :

MM. L. MARGAILLAN	Chimie industrielle.
G. CORROY	Géologie et Minéralogie.
P. CHOUX	Botanique Générale.
R. CERIGHELLI	Agronomie Tropicale.
P. ROUARD	Physique Générale.
J. VALENSI	Mécanique des Fluides.
P. DESNUELLE	Chimie Biologique.
M. ABELOOS	Zoologie Générale.
R. MERIGOUX	Physique industrielle.
P. VINCENSINI	Calcul différentiel et intégral.
E. CALVET	Chimie Générale.
P. BENOIT	Physiologie.
Ch. FEHRENBACH.....	Astronomie.
A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère.
A. GUILLEMONAT.....	
chargé d'enseignement.	Chimie M. P. C.

Professeurs sans Chaire :

MM. C. JAUSSEMAN	Physique M. P. C.
J. M. PERES	Biologie Animale.
R. MOLINIER	Biologie Végétale.

Maîtres de Conférences :

MM. G. CARPENI.....	Physique P. C. B. — S. P. C. N.
H. CABANNES	
P. COTTON	
J. TIMON-DAVID	Biologie animale — P. C. B.
L. FOURES	Mathématiques générales.
Mme L. FOURES	Mathématiques M. P. C.
J. METZGER	Chimie P. C. B.

Chargés de Conférences :

MM. G. MALCUIT	Botanique Appliquée.
Mme S. TAXY-FABRE	Géographie physique et appliquée.
MM. B. GOUZON	Physiologie.
M. NAUDET	Chimie Analytique.
G. GOUVERNET	Sciences Naturelles.
J. MORIN	Physiologie Générale.
DELPECH	Psychologie.
CHARLIER de CHILLY	Mathématiques.
J. BRUN	Mathématiques.
METRAL	Mathématiques.
DURAND	Physique.
Mlle GAVINI	Psycho-physiologie.

AVANT-PROPOS.

Dès la découverte de la phosphomonoestérase alcaline du plasma s'est posé le problème de son origine et de sa régulation. Provenait-elle d'un tissu particulier ou de plusieurs ? Les phosphatases de ces divers tissus étaient-elles semblables ou différentes ? L'enzyme plasmatique était-il excrété ou détruit, et par quel organe ?

Les premières tentatives utilisèrent les différences d'action des effecteurs sur les divers phosphatases. Mais cette méthode se montra rapidement critiquable, et c'est par la suite, surtout avec des techniques physiologiques, que furent abordées ces questions. Enfin, l'étude cinétique donna lieu à quelques travaux, relativement peu nombreux et impossibles à coordonner du fait de la différence des techniques employées.

Nous nous sommes proposés d'apporter dans ce travail une contribution à la solution de ce problème, essentiellement par l'étude de la cinétique des phosphatases du sérum et de divers organes.

Notre expérimentation a été réalisée au Laboratoire de Chimie-Biologique de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille (Professeur J. ROCHE puis Professeur Y. DERRIEN). Après nous avoir initié à la Recherche Scientifique, notre Maître le Professeur ROCHE nous a orienté vers l'étude des phosphatases. C'est lui qui tout au long de ce travail nous a dirigé et conseillé. Il a su nous persuader que, pour le clinicien que nous sommes, la biochimie était non seulement une source d'informations indispensable, mais aussi une discipline permettant d'acquérir une rigueur de raisonnement que la clinique enseigne plus difficilement. Il ne nous a ménagé ni son temps ni sa peine et nous sommes heu-

reux de lui exprimer notre très profond et très respectueux attachement.

Monsieur le Professeur DESNUELLE a bien voulu accepter la présidence de notre Jury. Il nous a guidé avec bienveillance. Nous lui adressons nos très vifs remerciements.

Nous tenons également à remercier les membres de notre Jury, Monsieur le Professeur BENOIT et Monsieur le professeur CALVÉ.

Monsieur le Professeur BUGNARD, Directeur de l'Institut National d'Hygiène (Paris) auquel nous appartenons depuis 1949 nous a permis par son aide de mener à bien ce travail. Monsieur le Professeur DERRIEN a bien voulu nous donner l'hospitalité dans son Laboratoire. Nous tenons à leur témoigner à tous deux l'expression de notre très profonde reconnaissance.

PREMIÈRE PARTIE.

INTRODUCTION.

CHAPITRE I.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE LA SPÉCIFICITÉ D'ORGANE DE LA PHOSPHOMONOESTÉRASE ALCALINE ET PHOSPHATASÉMIE.

A. — Action des effecteurs et spécificité tissulaire.

La diversité d'action des effecteurs a conduit à la notion de spécificité tissulaire des phosphatases. On a reconnu par la suite que l'action des effecteurs était variable selon les conditions d'expériences, en particulier selon le degré de purification de l'enzyme (Cf ROCHE J. the enzymes. Vol. 1, part. I, p. 485). C'est ainsi que les ions Mg^{++} ou Mn^{++} qui sont parfois inactifs sur des phosphatases (pses) brutes sont activateurs après purification de celles-ci (MARTLAND et ROBISON [129], BAMANN [13], ALBERS [4]. De plus, certains activateurs présentent une concentration optima au-delà de laquelle leur action diminue ou même s'inverse. Certaines substances peuvent être réputées activatrices parce qu'elles bloquent un inhibiteur naturel. Par exemple, les cyanures alcalins à faible concentration (1.10^{-5} à 1.10^{-4} M) activent certains extraits tissulaires (foie, intestin) riches en métaux inhibiteurs, en formant des complexes avec ces derniers. Mais ils sont, aux mêmes concentrations, inhibiteurs des phosphatases purifiées.

Ces constatations « expliquent que l'on ne doit pas considérer une activation ou une inhibition comme toujours significative, même si elle se produit régulièrement et si elle est reproductible en toutes circonstances » (ROCHE J. the enzymes 1950).

Cependant, la diffusion importante de ces études nécessite qu'elles soient exposées dans ce travail. Nous ne les envisagerons que dans leur rapport avec la notion de spécificité tissulaire.

L'ion magnésium active la pse de la plupart des organes à l'exception de celle de l'os (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [18]). De même ROSSI [171], MOZOK et WYNNE [141] constatent une sensibilité différente de l'enzyme selon le tissu d'origine. En réalité, ROCHE, FILIPPI, LEANDRI [159] ont montré que la pse osseuse était activable par Mg^{++} et ROCHE, LARAUMIGUIÈRE et LAURENS [165] constatent une action activatrice sur toutes les pses.

L'acide arsenique serait inhibiteur pour toutes les pses sauf pour celle du sérum (BRAUNSTEIN [23]).

Les effets inhibiteurs de deux formes tautomériques de cyanure ne sont pas les mêmes selon le tissu d'où provient la pse (MONCHE et JIMENEZ-VARGAS [138]) ; GUTMAN et JONES [84] constatent une inhibition importante par l'ion cyanure de la pse sanguine normale et pathologique (ictère, maladie osseuse), alors que l'action est au contraire peu marquée sur celle du foie, mais pour LAURENS [115], ces variations sont liées à la présence d'impuretés naturelles.

Les fluorures inhibent la pse de l'os et sont sans action sur celle du rein et du sérum (MUNEMURA [143], BELFANTI et Col.) ; alors que pour ROCHE, LARAUMIGUIÈRE et LAURENS, ils inhibent l'enzyme du foie, des globules blancs et sont sans action sur celui de l'intestin, de l'os et du rein.

L'acide cholique inhibe toutes les phosphatases sauf celle de l'intestin (O. BODANSKY [21], TAKATA [183]). Cependant pour ROCHE, LARAUMIGUIÈRE et LAURENS il s'agit simplement d'inhibition de degrés différents plus faible sur la pse intestinale que sur les autres. L'hyperphosphatasémie après repas riche en lipides serait peu inhibée par le taurocholate ; ce qui pour GOULD [81] signerait son origine intestinale. Pour LOPEZ, NAVARRO

[128], la pse sécrétée par l'intestin sous l'influence de l'alimentation serait même activée par le taurocholate.

Les oxalates inhibent la pse du sérum et de l'os, mais sont sans action sur celle du foie et du rein (BELFANTI et Col.). Cependant, celle de ce dernier organe est également inhibée pour MUNEMURA. ROCHE et Col. constatent une inhibition nette sur l'os et les globules blancs, alors qu'elle est peu marquée pour le foie et l'intestin.

L'acide ascorbique active à forte concentration la pse du sérum, du rein, du foie et de l'intestin, mais inhibe celle de l'os (LAURENS).

Pour KING et DELORY [105], ROCHE et ABUL-FADL [168], l'action de l'aldéhyde formique et de l'acétate d'ammonium permet de différencier la pse du rein de celle de l'intestin, et pour HERBERT [89], l'inhibition spécifique par l'alcool et le formol montre que le sérum contient un mélange d'enzymes de différentes origines.

La sulfapyridine activerait de 7 p. 100 la pse du sang normal. Dans le rachitisme elle l'inhiberait de 37 p. 100, ce qui prouverait l'origine anormale de l'enzyme sérique dans ce cas (GENEST et BERNARD [72]).

La phlorydzine et divers corps voisins inhibent fortement les enzymes du rein, de l'os et du cerveau, et faiblement ceux du sérum et du foie (REBATTU et COURTOIS [153]).

Malgré de nombreuses contradictions, ces travaux ont donc permis de poser le problème de la spécificité tissulaire des pses. Mais, en raison même de ces contradictions, ils ne permettent pas de les résoudre. Cependant, BELFANTI et ses Col. ont crû pouvoir séparer deux types de pses : os-sérum, et foie-rein. BODANSKY distingue l'enzyme de l'os de ceux du rein et du foie, et LAURENS individualise trois groupes : os ; intestin ; foie-sérum. De plus, l'action des effecteurs a fourni quelques hypothèses sur la nature même de cette spécificité. C'est ainsi que pour CLOETENS [43] il existerait deux pses alcalines différentes par leurs constituants métalliques. Mais ROCHE et ABUL-FADL pensent avec plus de vraisemblance à une nature différente de l'apoenzyme.

Par contre, aucune conclusion cohérente ne peut être retenue quant à l'origine de la pse du sérum. Les critiques que nous avons émises au début de ce chapitre expliquent cet échec.

B. — Le pH optimum et la spécificité tissulaire.

On sait que l'étude du pH optimum a permis de distinguer quatre groupes de phosphomonoestérases dites iso-dynamiques (FOLLEY et KAY [67, 68], et ROCHE et COURTOIS [169]). Mais à l'intérieur même du groupe 1 dit alcalin, de légères différences ont été observées qui ont permis à quelques auteurs de supporter la théorie de la spécificité d'organes. C'est ainsi que pour MOTZOK et WYNNE [141], le pH optimum est de 9,85 pour l'os, le rein et le foie, et de 9,2 pour l'intestin. Mais cette distinction est critiquable. En effet, la destruction spontanée de l'enzyme à certains pH interfère avec son activité (ROCHE, NGUYEN VAN THOAI et BAUDOUIN [164]). De plus, la présence d'effecteurs très répandus comme le magnésium et le zinc déplace le sommet de la courbe (SADANISSIAN [175], GOMORI [76]). Les protéines se comportent à cet égard comme des effecteurs et AEBI [2] a montré que le pH optimum, différent pour la phosphatase rénale et sérique devenait identique si l'hydrolyse par l'extrait rénal était effectuée en milieu albumineux.

Les divers tampons utilisés modifient également le pH optimum ce qui interdit de comparer bien des observations faites par des auteurs différents (AEBI [2], GOMORI [76]).

Enfin, AZAKAWA, NEUMANN [144], MOTZOK et WYNNE [141] ont montré que le pH optimum dépend dans une certaine mesure de la concentration du substrat. En règle, pour la phosphomonoestérase 1, il est d'autant plus proche de la neutralité que la concentration en substrat est plus faible. C'est ainsi que MOTZOK et

WYNNE trouvent les valeurs suivantes pour la phosphatase du plasma de poulet.

pH optimum	Concentration en substrat β glycérophosphate de soude
9,65	0,004 M.
9,88	0,08 M.

Cette constatation est en relation avec un fait que nous étudierons par la suite : l'affinité pour le substrat diminue quand le pH augmente. Elle comporte de plus une conséquence physiologique. Le pH optimum, apparemment très alcalin, paraît être dans les conditions normales (faible concentration des esters phosphoriques des tissus et humeurs) sinon identique au pH biologique, du moins beaucoup plus proche de lui.

Le pH optimum est donc d'autant plus alcalin que la concentration en substrat est plus grande. Mais sa valeur est trop variable selon les conditions d'expérience, pour servir de base à l'étude de la spécificité des pses.

C. — Etude cinétique de la phosphomonoestérase alcaline.

Nous ne ferons que rappeler la conception de MICHAËLIS et MENTEN [134], qui, les premiers, supposèrent que l'action enzymatique était due à la formation d'un complexe instable entre l'enzyme et le substrat. Cette conception du composé enzyme-substrat s'est montrée extrêmement fructueuse bien qu'elle ait été longtemps purement hypothétique.

Appliquant à la combinaison enzyme-substrat, la loi d'action de masse, MICHAËLIS et MENTEN arrivèrent à définir une constante spécifique d'un enzyme et d'un substrat dans des conditions déterminées :

$$K_m = \frac{(E - ES) \cdot S}{ES}$$

E représente la concentration de l'enzyme, S celle du substrat et ES, celle du composé enzyme-substrat.

A une activité correspondant à la moitié de l'activité enzymatique maxima, c'est-à-dire quand $ES = \frac{E}{2}$, Km devient égal à S, ce qui permet d'en déduire aisément la valeur.

Km est habituellement appelé constante de MICHAËLIS. Son inverse KM traduit l'affinité de l'enzyme pour le substrat aussi cette valeur est-elle appelée constante d'affinité. Comme COURTOIS [46], nous avons préféré pour notre étude ce dernier mode de représentation.

1. — MÉTHODES DE MESURE DE Km.

a) MICHAËLIS et MENTEN [134] portent en ordonnée les vitesses initiales et en abscisse le logarithme de la concentration en substrat. Cette courbe présente un point d'inflexion et le calcul permet aisément de vérifier qu'il correspond à $S = Km$. Il suffit de fixer expérimentalement quelques points de la courbe pour déterminer Km par la tangente au point d'inflexion.

b) EULER et LAURIN [63] portent en abscisse de progression arithmétique la concentration moléculaire du substrat, et en ordonnées arbitraires la vitesse de réaction. La courbe est asymptote à une parallèle de l'axe des abscisses, d'ordonnée V (vitesse maxima) et la parallèle d'ordonnée $v = \frac{V}{2}$ coupe la courbe en un point d'abscisse $S = Km$.

c) LINEWEAVER et BURK [122] inscrivent la relation sous la forme d'une droite, de la manière suivante : soit v, la vitesse d'hydrolyse en un point donné, et V la vitesse maxima. Il est facile de calculer que :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{Km}{V.S.}$$

la variation de $\frac{1}{v}$ en ordonnées, en fonction de $\frac{1}{S}$ en abscisses se représente par une droite de pente $\frac{Km}{V}$, cou-

pant l'axe des ordonnées pour l'ordonnée $\frac{1}{V}$. La pente de la droite permet donc de mesurer K_m .

2. — FACTEURS MODIFIANT OU NON L'AFFINITÉ.

a) *Concentration en enzyme.* — Comme il est possible de le calculer, l'affinité doit être indépendante de la concentration en diastase. L'expérimentation confirme les prévisions théoriques (MICHAËLIS et MENTEN [134], EULER et LAURIN [63], COURTOIS [46].

b) *Purification.* — Pour H. et E. ALBERS [3], la purification diminue l'affinité de la pse rénale. Plus récemment, AEBI [2] trouve (38° — tampon véronal Na — Cl — β glycérophosphate de soude) pour K_m :

pH	Rein brut	Rein purifié
9.6	0,00122	0,00115
9.2	0,0031	0,0020

c) *Effecteurs.* — ROCHE et THOAI [163] ont montré que le magnésium diminuait K_m . Ces données ont été confirmées par GOMORI [76] pour le β glycérophosphate. Par contre, pour cet auteur, l'affinité du phényl-phosphate n'est pas modifiée par le magnésium. De même, AEBI trouve une légère diminution de K_m en présence de magnésium, quelle que soit la nature du tampon (substrat β glycérophosphate).

d) *Mélange tampon.* — Il ressort du travail d'AEBI que la nature du mélange tampon influence la valeur de K_m . L'ion CO_3^{--} en particulier semble diminuer l'affinité de manière appréciable. Cependant, les expériences de cet auteur sont pratiquées à des pH différents pour les divers tampons et il est difficile de les comparer entre elles.

e) *Température.* — Selon GOMORI [76] son action est minime de 27° à 47° en l'absence de magnésium et faible encore en présence de ce métal.

f) *pH*. — Pour JACOBSEN [96], l'activité de la phospho-monoestérase alcaline du rein (β glycérophosphate. 39°) varie de 20.000 (pH 8,5) à 10.000 (pH 8.7) et à 222 (pH 10,0). Dans un article suivant, JACOBSEN trouve 20.000 (pH 8.5) 1.670 (pH 8.7) 1.100 (pH 8.8) 900 (pH 8.9) 670 (pH 9.0) et 500 (pH 9.2). (Ces valeurs, déduites de celles de l'auteur, exprimées en Km).

FOLLEY et KAY [67] trouvent également sur la pse mammaire une augmentation de Km de pH 10. à pH 8,9.

COURTOIS [46], étudiant les variations de KM en fonction du pH pour la takadiastase (β glycérophosphate et α glycérophosphate), l'uréase et la lactase, constatent que KM diminue quand le pH augmente pour le premier de ces enzymes, la relation étant inverse pour les deux autres. De plus, cet auteur, inscrivant la courbe Log KM (en ordonnée) par rapport au pH (en abscisse) suggère que le log. de l'affinité semble être une fonction linéaire du pH.

Tout se passe comme s'il existait une relation

$$\log KM = (a. pH) + b$$

où a et b sont des constantes fonction de la diastase et du substrat.

Il faut cependant remarquer à la lecture de ce travail que les courbes sont établies sur un nombre bien faible de points : (4 pour la takadiastase, 7 pour l'uréase, 6 pour la lactase) et qu'il semble que ce soit un peu arbitrairement que l'auteur les relie par une droite, certains points étant manifestement groupés en dehors de la courbe.

Pour AEBI d'ailleurs, KM dépendrait du pH beaucoup sur le côté alcalin de la courbe d'activité, peu sur le côté acide. De plus, si l'on inscrit en fonction du pH les valeurs obtenues par JACOBSEN [96], on obtient non pas une droite, mais un segment de courbe fortement infléchi. Cependant, les mesures de cet auteur sont faites dans des limites de pH trop étroites pour donner une idée précise des variations de l'activité.

Il semble donc que pour les phosphatases, l'affinité

varie en sens inverse du pH. Cependant, il n'existe aucune étude systématique de ce phénomène, portant sur un assez grand nombre de déterminations pour pouvoir définir exactement la relation : affinité — pH.

g) *Nature du substrat.* — Les variations de K_m selon la nature du substrat sont trop connues pour que nous insistions. Nous les signalons cependant, pour rappeler que les résultats ne sont comparables que si le substrat employé est le même.

h) *Concentration en substrat.* — Pour des concentrations élevées en substrat, la courbe vitesse d'hydrolyse-concentration en substrat peut ne plus répondre à la conception de MICHAËLIS et MENTEN. Cette inhibition est due à la formation d'un complexe répondant à la formule ES^2 et non ES . COURTOIS a étudié le phénomène sur les pses acides, et plus récemment AEBI sur les phosphatases alcalines. Cette inhibition peut compliquer l'interprétation graphique des courbes pour la recherche de K_M (dans ce cas, on obtient par la méthode de EULER et LAURIN des valeurs d'affinité inexactes et supérieures à celles obtenues par la méthode de MICHAËLIS et MENTEN).

i) *Concentration en ion phosphate.* — L'ion phosphate agit comme inhibiteur concurrent. Pour MARTLAND et ROBISON [129] l'inhibition de l'activité est à peu près nulle à $PO_4^{---} 0,005M$ de 20 p. 100 à $0,017 M$ et de 50 p. 100 à $0,033 M$.

j) *Provenance de l'enzyme, K_M et la question de la spécificité tissulaire.* — Les conditions d'expérience devant être strictement identiques, bien peu de résultats sont comparables entre eux. Cependant O. BODANSKY, 1946 [21] (β glycérophosphate pH 9,0 à 9,2, présence de magnésium et d'alanine) trouve $K_m = 0,0019$ pour l'os de rat et $0,0029$ pour l'intestin de rat. Cet auteur constate d'ailleurs que la glycine est un inhibiteur concurrent de la phosphatase osseuse et non concurrent de celle de l'intestin.

AEBI [2] trouve les résultats suivants (Veronal — NaCl — β glycérophosphate — pH mesuré à 25° — température 38°).

pH	Tampon	Rein brut	Rein pur.	Sérum
9.6	NH ³ NH ⁴ Cl	0,00122	0,00115	0,00116
9.2	Véronal-Na Na-Cl	0,0031	0,0020	0,0011

Il est d'ailleurs curieux que cet auteur, tenant compte seulement des résultats à pH 9,6 — NH³/NH⁴ Cl, conclue à l'identité des phosphatases rénales et sériques.

Ces différences permettent-elles d'affirmer la différence de nature des ferments envisagés ? C'est poser là une question que nous nous réservons de discuter au chapitre de Recherches Personnelles.

Il n'existe donc aucune étude d'ensemble précise de l'affinité de phosphatases selon leur provenance et selon le pH. Les conditions expérimentales étant dissemblables d'une expérience à l'autre, il n'est pas possible de confronter les résultats des divers auteurs. Par suite, il est inutile de dresser un tableau des valeurs trouvées dans la littérature. Il ressort pourtant des études précédentes que K_m est variable avec le pH, la température, la présence d'effecteurs (magnésium, protéines), la nature du tampon, celle du substrat, et la provenance tissulaire de l'enzyme. Un certain nombre de ces conditions peuvent être rendues invariables au cours d'une expérience. Mais la différence de K_m entre deux phosphatases isodynames reste toujours suspecte d'être due à la présence d'un effecteur et devra donc être utilisée avec précaution pour étayer l'hypothèse de la spécificité tissulaire.

CONCLUSION DU CHAPITRE I.

Toutes les techniques utilisées dans ce chapitre (étude des effecteurs, du pH optimum, de K_m) pour établir la

spécificité tissulaire des phosphatases et l'origine de la phosphatase du sérum se sont révélées incertaines dans leurs résultats et leurs applications. Cependant, la confrontation bibliographique est plutôt en faveur de la spécificité tissulaire. Celle-ci a d'ailleurs été interprétée de manières différentes selon les auteurs. Si BELFANTI et Col., BODANSKY semblent considérer que chaque tissu ou groupe de tissu possède un enzyme spécifique, CLOETENS envisage le mélange en proportions variables de deux enzymes différents par leur co-ferments métalliques. GOMORI [76] à la suite d'expériences sur des enzymes vieillis a d'ailleurs soutenu de nouveau que la phosphatase alcaline A_1 était en réalité un mélange de trois formes x, y, et z, pouvant d'ailleurs partiellement être converties l'une dans l'autre.

Par contre, le problème de l'origine de la phosphatase sérique ne paraît pas avoir été résolu par des techniques purement biochimiques.

CHAPITRE II.

ORIGINE ET NATURE DE LA PHOSPHATASE DU SÉRUM. ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE.

A. — La phosphomonoestérase alcaline du sérum.

La phosphatase alcaline est constamment présente dans le sérum à un taux variant légèrement avec certaines conditions physiologiques que nous allons étudier.

Influence de l'âge. — Chez le chien et chez l'homme, la phosphatasémie, déjà élevée à la naissance (7 unités BODANSKY), augmente encore jusqu'au 2^e mois puis reste au même taux jusqu'à la fin de la 2^e année (SMITH [179], STEARNS et WARWEG, A. BODANSKY [20], BARNES et MUNKS DUDLER [58]), chez le rat, l'évolution est inversée NEUMANN [144], les valeurs étant plus élevées chez l'adulte que chez le jeune. Chez les enfants plus âgés, elles sont variables (5 à 14 unités Bodansky : MORRIS, STEVENSON, PEDEN et SMALL, COMPERNOLLE) avec un maximum de 10 à 14 ans (JAFFE et BODANSKY [98], TUBA, CANTOR et SIEMENS [192]). Par la suite, chez l'homme (VERMEHREN [196]), comme chez le bœuf et le mouton (ALLCROFT et FOLLET [6], la phosphatasémie diminue au fur et à mesure que l'âge augmente. Ces constatations soulignent l'existence d'un certain parallélisme entre la phosphatase sérique et l'ostéogénèse : ceci est évidemment en faveur de l'origine osseuse de la phosphatasémie.

Influence du sexe. — Sur plus de 200 individus, TUBA, CANTOR et SIEMENS trouvent une activité phosphatasique

de 20 à 30 p. 100 supérieure dans le sexe masculin. Nous verrons par la suite que la phosphatasémie augmente chez les femelles au cours de la grossesse et de la lactation.

Influence de la saison. — Des enfants sains, âgés de 2 ans au moins présentent en hiver une phosphatasémie supérieure à celle de l'été (VERMBHREN et Col. à Copenhague).

KLASMER, TUBA, CANTOR, SIEMENS et CAPSEY [192], qui trouvent des résultats semblables, les attribuent à une carence vitaminique et solaire, suggérant, ici encore, l'origine osseuse de cette hyper-phosphatasémie.

Influence de l'alimentation et du jeûne. — Le jeûne entraîne une diminution de la phosphatasémie aussi bien chez le chien (BODANSKY [20]), que chez le rat (BODANSKY et JAFFE, 1931 [19], GOULD [82]). Chez le rat, la diminution débute à la 8^e heure du jeûne, atteint sa valeur minima à la 24^e heure, puis reste constamment basse (WEIL et REUSSEL, 1940 [203]). La rapidité de ces variations montre bien que des modifications au niveau des organes jouant un rôle métabolique et d'absorption (foie, intestin) se reflètent sur l'état enzymatique du sérum et qu'une partie de la phosphatase sérique y trouve probablement son origine (BAUR [16]). En effet, un mécanisme indirect, par action sur l'os du trouble métabolique nécessiterait des délais d'action beaucoup plus prolongés. Le rôle de l'intestin est encore confirmé par l'hyperphosphatasémie après repas gras (GIRIK et SHOURIE [73]).

Modifications dues à des facteurs pathologiques. — Bien qu'elles n'entrent pas à proprement parler dans le sujet de cette étude, leur importance est considérable dans la discussion de l'origine de la phosphatasémie. Aussi nous permettrons-nous un bref rappel pathologique. L'hyperphosphatasémie s'observe dans deux groupes d'affection :

— les premières sont osseuses : représentées d'abord

par la maladie de Paget, puis par les métastases osseuses de cancer, l'ostéose-hyperparathyroïdienne, le rachitisme, ...Ceci suggère comme l'a fait ALBRIGHT un parallélisme entre la phosphatasémie et l'activité des ostéoblastes ;

— le deuxième groupe est hépatique, il se compose uniquement des ictères par obstruction et des ictères par hépatite quand ils présentent des phénomènes de cholestases associés. Ces données permettent de supposer que le foie joue peut-être le rôle d'un organe excréteur ou destructeur de l'enzyme. Nous retrouverons cette hypothèse à l'étude expérimentale des hyperphosphatasémies.

De cette étude nous tirerons les conclusions suivantes : La phosphatasémie varie selon les conditions physiologiques (âge, sexe, régime) dans d'assez larges limites pour exclure toute idée préconçue d'un mécanisme régulateur.

L'étude des variations de l'enzyme selon l'âge ou la saison et des hyperphosphatasémies des maladies des os rend très probable l'origine osseuse d'une partie de la phosphatase sérique.

De même les relations de la phosphatase sérique avec l'intestin et le foie (ou bien l'un ou l'autre de ses deux organes) ressortent de l'influence du jeun ou de l'alimentation. Par contre, aucun rapport très précis n'a pu être émis entre la phosphatasémie et le rein. Il semble donc probable que plusieurs tissus : os, et intestin ou foie en particulier, déversent dans le sérum une quantité de pse variable selon leur activité. Ceci implique que cet enzyme soit également détruit ou excrété par un ou plusieurs organes. Nous avons vu que la constatation d'hyperphosphatasémie dans les ictères permettait d'envisager le rôle du foie.

Nous allons essayer par l'étude de l'enzyme des organes de préciser ces notions.

B. — Les phosphatases des tissus.

Sources et émonctoires possibles de la phosphatasémie.

1. — LA PHOSPHATASE OSSEUSE.

C'est dans l'os que ROBISON [155] découvrit la phosphatase. Sa concentration y est à peu près égale à celle du cortex rénal et un peu moins de la moitié de celle de la muqueuse intestinale. Elle y est parallèle à l'intensité de l'ostéogénèse, aussi bien chez les mammifères que chez les poissons (ROCHE et BULLINGER [161], ROCHE et COLLET [160]). Chez le lapin, après ostéotomie, apparaît au niveau du cal une augmentation variable de la phosphatase. Au cours du rachitisme expérimental du Rat ou du Lapin (KODAMA et TAKAMATSU [109], ROCHE et SIMONOT [162]), l'enzyme est très augmenté dans les os (tibia, fémur, omoplate, crâne, incisives) mais également dans les reins, l'intestin, le foie et les surrénales. Par contre, LECOQ [117] trouve une diminution de la phosphatase dans l'os chez le rat et DIKSHIT et PATWARDHAN [53] montrent que l'enzyme est d'abord augmenté puis considérablement diminué. Au cours du scorbut chez le cobaye, il existe une diminution parallèle de la phosphatase dans le sérum et dans les os, mais pas au niveau des autres tissus (GOULD et SCHWACHMAN [80]).

Secondairement à ces variations de la phosphatase osseuse de causes diverses, on constate des variations de l'enzyme du plasma. Bien connue au cours du rachitisme humain et expérimental, l'augmentation du ferment sanguin se retrouve de même chez le lapin après ostéotomie. De nombreux procédés expérimentaux permettent encore de faire varier phosphatase osseuse et plasmatique. C'est ainsi que l'implantation de magnésium dans le tibia du rat entraîne une augmentation parallèle du ferment dans l'os et le sérum : CARTIER et SIMONART [35]. A l'inverse, la carence en magnésium diminue les deux enzymes (SNYDER et TWEEDIE [180]). La carence en manganèse chez la poule agit de même

(WIESE, JOHNSON, ELVEHJEM, HART et HALPEN [205]). WIESE, BENHAM, ELVEHJEM et HART [206]. Dans ce dernier cas, l'adjonction de magnésium ne supprime pas la baisse de l'activité enzymatique ce qui permet aux auteurs de conclure à une diminution réelle de la phosphatase et non à une coactivation. Chez le rat, par contre, la carence en manganèse ne modifie pas la phosphatase osseuse, mais augmente celle du sang (WACHTEL, ELVEHJEM et HART [199]).

Le parallélisme si fréquent de l'augmentation de la phosphatase dans l'os à la suite de processus physiologiques ou pathologiques et d'une hyperphosphatasémie souligne encore l'origine osseuse probable d'une partie tout au moins de la phosphatase sérique. Cette hypothèse est encore confirmée par les expériences d'ARMSTRONG et BANTING [10] : l'extirpation de l'intestin, du foie, du rein, de la rate, du pancréas, des gonades, etc... entraîne une hyperphosphatasémie dont l'origine osseuse est bien probable.

L'origine osseuse d'une partie de la phosphatase du sérum paraît donc pratiquement démontrée.

2. — LA PHOSPHATASE INTESTINALE.

L'intestin est de tous les organes le plus riche en phosphomonoestérase alcaline. Comme pour l'os plusieurs observations témoignent d'un certain parallélisme entre activité phosphatasique intestinale et plasmatique. Nous avons vu que le jeûne fait rapidement baisser la phosphatasémie chez le chien (BODANSKY [20]). De même, dans ces conditions, la phosphatase intestinale diminue, chez le rat, (LAVIALDI [115 bis]). Chez le rat à jeûn, l'absorption de corps gras entraîne une augmentation de la phosphatasémie qui atteint un niveau plusieurs fois supérieur à son taux de départ (GIRIK et SHOURIE [73]). Pour WEIL et RUSSELL [203], seuls les acides gras insaturés à poids moléculaires élevés (C. 18), la céphaline et différentes huiles seraient actifs, les protéines n'ayant

aucune action. Le régime de sucre diminue au contraire des graisses la phosphatase intestinale (LAWRIE et YODKIN [116]).

Une partie de l'enzyme produit dans les cellules de la muqueuse, en particulier sous l'action du repas gras va se retrouver dans les fécès (LEVENE et DILLON [119]), J. LOPEZ-NAVARRO [123]). Mais le parallélisme relatif entre la phosphatase intestinale et la phosphatase sérique rend probable le passage dans le sang d'une fraction de l'enzyme. Celui-ci semble d'ailleurs avoir été confirmé par l'expérimentation :

Pour FLOCK et BOLLMAN [64] au cours du repas gras, le volume de lymphé intestinale est doublé, mais l'activité phosphatasique de cette lymphé est multipliée par 8. Au cours du repas sans graisse, le volume double également mais la phosphatase ne varie pas. Si la lymphé est dérivée par fistule ou ligature, la phosphatase n'augmente plus après repas gras.

Cependant, si l'origine intestinale d'une partie de la phosphatasémie semble probable, cette source n'est certainement pas exclusive comme le montrent les expériences d'ARMSTRONG et BANTING [10] et de J. B. DALGAARD [48] : l'éviscération complète qui comporte en particulier l'exclusion du foie et de l'intestin s'accompagne d'une rapide augmentation de la phosphatasémie.

3. — LA PHOSPHATASE HÉPATIQUE ET LES ICTÈRES PAR OBSTRUCTION EXPÉRIMENTALE.

La constatation par ROBERTS [154] d'une hyperphosphatasémie au cours des ictères par rétention a rapidement attiré l'attention sur le rôle primordial du foie. De nombreuses confirmations s'ajoutèrent à l'opinion de cet auteur (A. BODANSKY et JAFFE [19] — AUSTONI et COGGI [11] — KING et ARMSTRONG [104] — HERBERT [89] — ROTHMAN [172], GUTMAN, TYSON et GUTMAN [85] — CANTAROW [29] — FLOOD [65], etc...).

Par suite, la ligature expérimentale du canal cholédoque sur de nombreuses espèces de mammifères, a permis d'élargir l'étude des hyperphosphatasémies hépatiques.

Chez le chien, la ligature de la voie biliaire principale élève la phosphatasémie jusqu'à 100 fois sa valeur initiale (BODANSKY et JAFFE [19] — ARMSTRONG, KING et HARRIS [9] — FREEMAN, CHEN et IVY [69] — SCHIFFMANN et WINKELMANN [178]). Pour GAD [71], l'activité phosphatasique de base est, après ligature, multipliée par 40 dans le sérum, par 10 dans le foie et par 3 dans l'intestin et l'auteur suggère que la muqueuse intestinale abandonnerait au foie la plus forte quantité possible d'enzyme, ce dernier organe fonctionnant comme régulateur de la phosphatasémie.

L'acholie intestinale ne joue aucun rôle. En effet, l'administration par la bouche, de bile ne maintient pas la phosphatasémie à un taux normal (CINELLI [41]). Enfin, le rétablissement de l'écoulement biliaire entraîne un retour à la normale de la phosphatasémie, toutefois moins rapide que pour la bilirubinémie (CARR et FOOTE [34]).

Chez le rat la ligature du cholédoque entraîne entre les mains de WEIL et RUSSEL [203] non point une augmentation, mais bien une baisse de la phosphatasémie à partir de la 10^e-16^e heure. Cette diminution peut être supprimée par l'administration orale de bile de bœuf et les auteurs l'attribuent à une diminution de l'absorption des graisses, ce qui revient à souligner, chez le rat, l'origine intestinale de la phosphatase sérique. Cependant DALGAARD [48] reprenant ces expériences, montre que la baisse de l'activité enzymatique est due à l'inanition secondaire à l'anorexie post-opératoire : après un jeûne de 48 heures qui entraîne une activité phosphatasique basse mais constante, la ligature du cholédoque entraîne une hyperphosphatasémie significative. Celle-ci est cependant inférieure à celle que l'on obtient dans les mêmes conditions chez le chien ou l'homme et, chez le rat, par absorption d'huile d'olive.

On peut donc conclure que la ligature du cholédoque est bien suivie, chez le rat, comme chez le chien, d'une hyperphosphatasémie. Chez celui-là, cependant, l'origine probablement surtout intestinale du ferment sanguin modifie quelque peu les conditions expérimentales.

Chez le lapin, l'hyperphosphatasémie de l'ictère par rétention est identique à celle du chien (JALLING, LAURSEN et VOLGWARTZ [99] — HOFFMEYER, JALLING et SCHOENHEYDEN [92], BAUER [15]).

Chez le *chat* les ligatures du cholédoque ont été pratiquées par CANTAROW, STEWARD et MAC COOL [28] — THANNHAUSER, REICHEL, GRATTAN et MADDOCK [186] — FLOOD, GUTMAN et GUTMAN [65]. Pour tous ces auteurs, cet animal représente une curieuse exception. En effet, l'obstruction biliaire ne s'accompagne pas chez lui d'hyperphosphatasémie. L'explication en est facilement trouvée dans la perméabilité du rein de chat à la phosphatase alcaline comme à la bilirubine, alors que le rein des autres animaux est absolument imperméable à cet enzyme.

Cependant, DALGAARD [48] sur 10 chats, voit la phosphatasémie augmenter le 10^e jour après l'opération, atteindre un maximum vers le 17^e jour puis diminuer progressivement. Le taux de la phosphatase urinaire est sujet à de grandes variations et n'est pas augmenté après la ligature. Il faut donc pour cet auteur abandonner l'idée d'une excrétion rénale chez le chat.

Mise à part l'exception discutable du chat, la ligature de la voie biliaire principale entraîne donc comme l'ictère par rétention pathologique, une hyperphosphatasémie variable selon l'espèce, mais toujours importante.

D'autres expériences peuvent s'interpréter de manière identique. C'est ainsi que l'occlusion intestinale expérimentale augmente la phosphatasémie, probablement par le mécanisme d'une rétention ou d'une altération hépato-pancréatique (de VINCENTIS [198]). Les lésions hépatiques expérimentales par toxines ou infection à spirochètes (ARMSTRONG et KING, FREEMANN [69]) n'ont par contre aucune action.

Certains toxiques font cependant exception à cette règle, C.Cl^4 (DRILL et IVY, GUTMARAES-VILLELA et M. I. MELIO [83], CH Cl^3 , m-toluylène - diamine (A. BODANSKY [21]), salvarsan (ELTON [61], HANGER et GUTMAN [86]). Dans ces cas, il existe une hyperphosphatasémie plus ou moins importante que l'on peut attribuer à une cholestase intrahépatique par cholangite ou thrombi biliaires.

La cholecystectomie chez le chien entraîne une hyperphosphatasémie (DRILL, ANNEGERS, SNAPP et IVY [54], TANTURI CANEPA, BAY et BANFI [185]). Ce phénomène serait dû à une modification secondaire du sphincter d'Oddi et agirait en définitive par le mécanisme général de la rétention biliaire.

De même, la dérivation externe de la bile s'accompagnerait d'augmentation de la phosphatasémie. Mais ici, le mécanisme serait indirect, d'origine osseuse et secondaire à la décalcification (BARTOLOMUCCI [14]).

Le fait essentiel reste donc l'hyperphosphatasémie au cours de la rétention biliaire. Ceci peut être interprété de diverses manières :

- activation d'un enzyme en quantité normale ;
- hyperproduction d'origine hépatique ;
- hyperproduction d'origine extra-hépatique : osseuse, intestinale ;
- absence d'excrétion d'un enzyme qui continue à être déversé dans le sang par divers organes ;
- hyperproduction, rétention.

Toutes ces théories ont été soutenues sur la base d'arguments divers.

Nous éliminerons d'abord les observations histochimiques parce qu'elles sortent du cadre de notre étude. Signalons cependant, que les études de WACHSTEIN [200], SHERLOCK et WALSHE, KRITZLER et BEAUBIEN [100], HARD et HAWKINS [87] montrent une augmentation de la phosphatase dans les canalicules biliaires et les cellules hépatiques adjacentes que ces auteurs interprètent plutôt en faveur de la théorie rétentionnelle.

a) *Théorie de l'activation d'un enzyme en quantité absolue normale.*

THANNHAUSER, REICHEL, GRATTAN et MADDOCK [186], à la suite d'ictères par rétention expérimentale chez le chien ont soutenu que l'hyperphosphatasémie était due à une augmentation de l'activité enzymatique et non de la concentration de la phosphatase. Cette conception reposait sur l'étude de l'activation par l'acide ascorbique. Par la suite, les fondements expérimentaux de cette hypothèse furent considérés comme un artefact par KING et DELORY [105] et même par THANNHAUSER et ses Collaborateurs [186]. De même CANTAROW [30] démontra que le sérum ictérique n'active pas la phosphatase d'un sérum normal, ce qui exclue l'existence dans le premier, d'activateurs anormaux. Les expériences de DELORY et KING [51] confirment ce fait. L'hypothèse d'une hyperphosphatasémie par augmentation de la phosphatase et non par activation avait d'ailleurs été démontrée exacte par ALLCROFT et FOLLEY [6] au cours du rut, par GOULD [8] au cours de l'alimentation grasse chez le rat et par WILLIAMS et WATSON [207] au cours de la maladie de Paget.

b) *Deuxième hypothèse : sécrétion par le foie de la phosphatase sanguine en excès.*

MOYSON [142] trouve dans le sang sus-hépatique du chien une activité phosphatasique beaucoup plus élevée que dans le sang porte ou la veine fémorale ce qui suggère l'idée que chez l'animal normal, tout au moins, les cellules parenchymateuses du foie élaborent l'enzyme.

Cependant DE VRIES, MILDWIDSKY et RABINOVICCI [52], comparant l'activité phosphatasique, portale et systémique ne trouvent pas de différences susceptibles de fournir la preuve d'une excrétion ou d'une sécrétion hépatique.

OPPENHEIMER [147], OPPENHEIMER et FLOCK [148] pratiquent chez le rat l'ablation de 70 p. 100 du foie. Il se

produit une intense régénération hépatique. La phosphatase augmente d'abord dans le foie, puis à partir du 2^e jour, elle se maintient parallèle dans le plasma et le foie. Les auteurs interprètent ces faits expérimentaux en faveur de l'origine hépatique de la phosphatase du sang. Il nous semble cependant qu'ils pourraient être aussi bien retenus en faveur de la théorie rétentionnelle, le foie retenant d'abord une phosphatase normalement sécrétée par d'autres tissus, puis, débordé, du fait de son insuffisance volumétrique, l'organe ne peut empêcher la phosphatasémie de s'élever. Ceci est d'ailleurs également l'opinion de DALGAARD [48].

Nous voyons donc que la théorie de l'hypersecretion hépatique ne repose sur aucun argument solide.

*c) Rétention dans le sang d'une phosphatase sécrétée
par divers tissus
et normalement excrétée par le foie.*

Cette conception très répandue a été fortement étayée par les travaux de DALGAARD. Cet auteur a d'abord montré [48 a] que contrairement à des travaux déjà analysés la dérivation biliaire externe chez le chien n'augmentait pas ou augmentait très peu la phosphatasémie. Celle-ci ne peut, en aucun cas, être causée par l'acholie intestinale. De plus, la fistule biliaire excrète une quantité de phosphatase suffisante pour expliquer l'hyperphosphatasémie rétentionnelle. Dans un travail suivant [48 c] DALGAARD pratique chez le chien soit une hépatectomie « fonctionnelle » par fistule d'Eck suivie de ligature de la veine porte, soit une hépatectomie totale, soit une ablation de tous les viscères digestifs de la cavité péritonéale. Dans tous les cas, se produit une augmentation brutale de la phosphatasémie, supérieure même à celle de l'ictère par obstruction biliaire. Ces résultats confirment ceux de ARMSTRONG et BANTING [10] et de MADDOCK, SCHMIDT et THANNHAUSER [126]. Ces expériences permettent d'affirmer que le foie est bien dans

les conditions physiologiques l'organe qui maintient à un taux peu élevé la phosphatasémie. Elles confirment d'autre part, que l'intestin n'est pas *le seul* formateur de phosphatase plasmaticque. En effet, au cours de l'éviscération totale la phosphatase augmente dans le sérum. DALGAARD a d'ailleurs démontré que l'ablation de l'intestin n'empêche pas l'hyperphosphatasémie de l'ictère expérimental [48 a]. Notons, cependant que l'hyperphosphatasémie est inférieure au cours de l'éviscération à ce qu'elle est au cours de l'hépatectomie (DALGAARD [48 c]), ce qui rend très vraisemblable l'origine partiellement intestinale de la phosphatase plasmaticque. L'ascension de la phosphatasémie beaucoup plus rapide au cours de l'hépatectomie qu'au cours de l'ictère par rétention, s'explique par le fait que, dans ce dernier cas, la bile est d'abord secrétée et stockée dans les voies biliaires avant que l'hyperpression biliaire n'inhibe la cellule hépatique. Le fait que la cholecystectomie préalable accélère l'ascension de la phosphatasémie en est une confirmation.

Ces travaux sont confirmés par l'expérimentation de SMITH, FREEMAN qui montre que la fistule d'Eck chez le chien entraîne une augmentation de la phosphatasémie parallèle à la diminution de la clearance du rose Bengale. Notons, cependant que pour DALGAARD la fistule d'Eck seule ne semble pas influencer la phosphatasémie.

Enfin, les résultats de CAIN, GUNDLAY, BOLLMANN, FLOCK et MANN [27] qui trouvent dans les lymphatiques du foie et du canal thoracique une activité p.tasique de 30 à 50 p. 100 moins élevée que dans le plasma sanguin, plaident plutôt en faveur de l'excrétion hépatique. Au contraire, au cours de l'ictère par rétention la phosphatase s'élève dans la lymphe thoracique et dans le sang (GONZALEZ-ODDONE [77]).

Si tous ces travaux prouvent de manière indiscutable que le foie élimine la phosphatase du sang et la maintient à son niveau physiologiquement bas, il n'en reste pas moins que l'excrétion biliaire de l'enzyme est loin

d'être démontrée. Elle est même fortement battue en brèche par les expériences suivantes qui tendent à prouver que la phosphatase biliaire n'est pas d'origine plasmatique.

CANTAROW et MILLER [31] transfusant du sang de chien ictérique à des chiens porteurs d'une fistule biliaire constatent que chez l'animal transfusé, la phosphatasémie reste élevée au moins 48 heures et qu'elle est très peu excrétée par la bile. Au cours d'expériences semblables, WANG et GROSSMAN [202] vérifient l'absence d'excrétion de phosphatase par la bile.

Notons cependant que ces résultats s'ils constituent une sérieuse objection à l'excrétion biliaire de la phosphatase, ne sont pas au-dessus de toute critique : il est en effet possible soit que l'épuration phosphatasique hépatique atteignant dans des conditions normales son intensité maxima, l'hyperphosphatasémie ne puisse plus augmenter l'excrétion (ceci expliquerait le facile retentissement du jeûne, du repas gras, de la croissance, etc... sur la phosphatasémie), soit que l'excrétion d'un enzyme hétérogène se fasse différemment de celle de l'enzyme de l'animal.

d) *Théorie mixte : Hypoexcrétion - Hypersecrétion.*

DRILL et RIGGS constatant que l'« Extra-phosphatase » des chiens et des hommes à foie lésé, contrairement à celle des animaux normaux est inhibée par le cyanure et ne peut être réactivée par Mg, soutiennent la nature différente des deux enzymes.

L'hyperproduction hépatique est bien difficile à admettre à la suite de cette constatation de DALGAARD (*loc. cit.*) : l'hyperphosphatasémie est plus intense après hépatectomie qu'après ligature des voies biliaires.

L'hyperproduction intestinale par trouble de la résorption des lipides, secondaire à l'acholie a, nous l'avons vu, été très fortement battue en brèche par DALGAARD [48 a]. Par contre, l'hyperproduction d'origine osseuse secondaire aux troubles du métabolisme phosphocalci-

que peut jouer un rôle (MORRIS et PEDEN [140]). Notons cependant que dans l'acholie rétentionnelle congénitale de l'homme au cours de laquelle l'ostéoporose est constante, la phosphatasémie est normale ou peu élevée.

Il paraît donc possible d'admettre que :

— *Le foie est le principal, sinon le seul organe responsable du contrôle de la phosphatase sanguine. Il ne semble, cependant pas agir par excrétion biliaire de l'enzyme.*

— *Le tissu hépatique ne joue pas un rôle prépondérant dans la sécrétion de la phosphatase dans le plasma. Cependant aucune preuve ne permet d'infirmer ni d'affirmer l'existence d'un excès de production parallèle au trouble de l'excrétion.*

4. — LE RÔLE DU PANCRÉAS EXOCRINE.

La présence de phosphatase alcaline dans le pancréas exocrine est très inconstante selon l'espèce : elle existe chez le chien (UMENO [193], GOMORI [74], JACOBY [97]) et chez le lapin, essentiellement dans les cellules canaliculaires (WANG, GROSSMAN et IVY [201], JACOBY [97]). Le pancréas du cobaye, du rat, du chat, du mouton, du bœuf, de l'homme n'en contiennent pas. Le suc pancréatique contient l'enzyme chez le chien (UMENO) mais la sécrétine et la pancréozymine ne l'augmentent pas (WANG, GROSSMAN et IVY). Toujours chez le chien, la ligature du wirsung produit 7 fois sur 10 une hyperphosphatasémie (6 à 8 fois la valeur normale).

Il semble donc possible que chez le chien, à l'exclusion de la plupart des autres mammifères et de l'homme, le pancréas intervienne dans l'élimination de la phosphatase plasmatique.

5. — LA PHOSPHATASE RÉNALE ET LE RÔLE DES REINS.

Malgré l'existence d'une haute concentration en phosphatase alcaline dans le rein, cet organe semble avoir

fort peu d'action sur la phosphatasémie. Les néphrites toxiques expérimentales chez le chien ne modifient pas la phosphatasémie (HEPLER, SIMONDS, GURLEY [88]). Il en est de même chez l'homme des maladies rénales sans retentissement osseux, à l'exception de la néphrose lipoïdique où elle est abaissée (GOTTFRIED, STEINMAN et KRAMER [79]). Mais cette affection s'accompagne de tels troubles de métabolisme qu'il est impossible d'en tirer un argument. Pour Kenzo ONO [146] la phosphatase rénale reste inchangée dans l'ictère par rétention et DALGAARD [48 d] a montré que la néphrectomie n'a aucune action sur la phosphatasémie et que combinée à l'obstruction expérimentale du choledoque elle n'empêche pas l'augmentation de l'enzyme plasmatique.

Nous verrons cependant que l'injection de testostérone augmente chez le rat la phosphatase sanguine et rénale tout en restant sans action sur les enzymes intestinaux, hépatiques et osseux (*vide infra*).

Il semble bien démontré de plus que le rein n'excrète pas de phosphatase alcaline : chez l'homme, l'urine contient des traces insignifiantes de phosphomonoestérase A.I. de taux d'ailleurs variable et sans rapport avec l'âge ni le sexe (FOLLEY et KAY [68], BURGEN [26], CHITRE et PAI [48]). L'urine de lapin n'en contient pas du tout (HORII et TOMIKAWA [95]). Seul, comme nous l'avons déjà vu, le chat présenterait une exception à cette règle, ce que conteste d'ailleurs DALGAARD (*loco citato*).

Nous voyons qu'il est possible mais non démontré, que le rein sécrète de la phosphatase dans le sang et qu'il est, d'autre part, certain que cet organe n'en excrète pas par l'urine (sauf exception possible pour le chat).

6. — LE RÔLE DE L'APPAREIL GÉNITAL.

a) *Prostate*. — En opposition à sa forte teneur en phosphatase acide, la prostate de l'homme et du singe ne paraît pas contenir de phosphatase alcaline (GOMORI

[74]). Au contraire, chez le chien, le chat, le rat, le lapin et le cobaye, la phosphatase alcaline est en quantité supérieure à la phosphatase acide. Mais même dans ces espèces il n'existe encore aucune preuve d'une relation entre l'enzyme de la prostate et celui du sérum.

b) *Testicules*. — La castration diminue la phosphatase alcaline du rein chez le rat et le hamster, alors qu'elle est sans action sur la phosphatase hépatique ou intestinale (KOCHAKIAN et FOX [106], KOCHAKIAN, BARTLETT et GONGORA, SOULAIRAC, DESCLAUX et TEYSSEYRE [182]). Cette diminution est entravée par les androgènes pour KOCHAKIAN, BARTLETT et GONGORA alors que pour SOULAIRAC et Coll. la testostérone est sans effet contrairement au di-éthyl-stilbœstrol.

L'application de propionate de testostérone augmente chez le rat la phosphatase sérique et celle du rein. Elle est sans action sur l'enzyme du foie, de l'intestin et de l'os (KOCHAKIAN et VAIL [107], BUCHWALD et HUDSON [25], KOCHAKIAN et FOX [106]). Seul CURTILLO [47] trouve un effet inverse sur la phosphatase sérique. Au contraire, chez la souris, les stéroïdes hormonaux diminuent l'activité phosphatasique du rein (KOCHAKIAN [108]).

Il semble donc n'exister aucun rapport entre phosphatase sérique alcaline et prostate. Par contre, les hormones androgènes augmentent l'activité phosphatasique du sérum et du rein, restant sans action sur celle des autres organes (exception : la souris).

7. — LE RÔLE DES ORGANES GÉNITAUX DE LA FEMELLE.

a) *Ovaires et hormones féminisantes*. — L'injection de stilbœstrol ou de di-éthyl-stilbœstrol est sans action sur la phosphatase sérique des rats. Par contre, l'œstradiol élève chez les jeunes animaux, le stilbœstrol abaisse chez les adultes la phosphatase osseuse (DAY et FOLLIS [49], BUCHWALD et HUDSON [25]). Le dipropionate d'œstradiol chez le pigeon augmente la phosphatase sérique

et osseuse (MANDEL, CLAVERT et MANDEL [127]). La phosphatase utérine est de même augmentée par l'œstradiol comme celle du vagin (JEENER [100]). La progestérone double environ la phosphatase du foie et du rein (RUSO [174]).

b) *Utérus, gravidité et placenta.* — Au début du dernier trimestre de la grossesse humaine, la phosphatase alcaline du sérum augmente jusqu'à la délivrance pour atteindre des valeurs doubles de la normale (CORYN [45], DUVOIR, LAYANI et PAUTRAT [60], CAYLA et FABRE [36], etc...). Cette augmentation peut être attribuée soit (plutôt) à la croissance osseuse du fœtus, soit à l'augmentation de l'enzyme dans l'utérus et le placenta. L'hyperphosphatasémie est d'ailleurs beaucoup plus importante en cas de grossesses gémellaires.

c) *Lactation et glandes mammaires.* — Chez la femme, la rate et le cobaye la lactation s'accompagne d'une nouvelle hyperphosphatasémie (après la chute de l'hyperphosphatasémie gravidique). Celle-ci dépend peut-être de l'augmentation de l'enzyme dans la glande mammaire (FOLLEY et KAY [68], FOLLEY et GREENBAUM [66]). Cependant pour CAPUTTO [33] la mammectomie pratiquée chez le cobaye pendant la lactation n'influence pas le taux de l'enzyme sanguin et l'on en peut conclure que chez cet animal tout au moins l'hyperphosphatasémie prend son origine dans un autre organe (foie ? intestin ?). Enfin, d'après FOLLEY et GREENBAUM [66], chez le rat, la surrénalectomie n'influence pas l'activité enzymatique de la glande mammaire.

Il apparaît donc que chez les femelles, l'hyperphosphatasémie de la grossesse et de la lactation ne peut être rapportée avec sûreté respectivement à l'utérus ni à la glande mammaire. L'action de l'ovaire et des hormones féminisantes paraît se faire tout au moins en partie par l'intermédiaire de l'os.

8. — ACTION DES GLANDES ENDOCRINES ET DU SYSTÈME NERVEUX.

a) *Surrénales.*

La surrénalectomie entraîne une ascension de la phosphatase osseuse (ARCURI et FILIPPON [8]), l'extrait surrénal total une diminution, la cortisone une augmentation (WILLIAMS et WATSON [207]).

La phosphatase *hépatique* est après surrénalectomie légèrement augmentée pour ARCURI et FILIPPON [8], de 27 p. 100 pour KOCHAKIAN et VAIL [107], cependant, pour ces derniers auteurs l'injection de cortine l'élève de 360 p. 100 chez le rat surrénalectomisé. Par contre, toujours chez l'animal surrénalectomisé la DOCA et la testostérone n'ont aucune action.

Chez le chat, le cobaye, le rat, la surrénalectomie entraîne une baisse parfois importante de l'enzyme rénal. Le chlorure de sodium, la DOCA, la testostérone ou la vitamine B₂ réduisent cette diminution alors que la cortine totale et divers stéroïdes ont peu d'action (JIMENEZ-DIAZ [101], KUTSCHER et WUST [112], FOLLEY et GREENBAUM [66], VAIL et KOCHAKIAN [195], KOCHAKIAN et VAIL [107], SOULAIRAC [181]). Sur les souris mâles castrées, KOCHAKIAN [108] contrôle que plus de 12 stéroïdes qui augmentent le poids du rein, diminuent son activité phosphatasique. Cependant, à cause de la grande dispersion des activités phosphatasiques chez la souris normale et surrénalectomisée, THOAI [188] ne peut affirmer un abaissement régulier de la phosphatase après surrénalectomie.

La phosphatase *intestinale* disparaît ou diminue après surrénalectomie pour VERNE et HUBERT [197], SOULAIRAC [181]. Par contre, TISSIERE [190] la trouve inchangée. Pour SOULAIRAC la diminution peut être supprimée par la vitamine B₁₂.

La surrénalectomie, tout comme les stéroïdes surrénaux sont sans action sur les phosphatases *mammaires* ou *musculaires*.

Enfin, d'après ARCURI [8], la surrénalectomie n'a aucun effet sur la *phosphatasémie* alors que LASZT trouve une diminution de 50 p. 100.

b) *Hypophyse.*

POUR LI, KALMAN, EVANS et SIMPSON [120] l'hypophysectomie diminue la phosphatase plasmatique. L'hormone thyroïdienne et gonadotrope augmentent la phosphatase osseuse. Après hypophysectomie l'hormone de croissance entraîne une élévation de l'enzyme localisée aux épiphyses et une hyperphosphatasémie, elle restaure les phosphatases hépatiques et rénales (WHICHER et WATSON [204], LI, KALMAN et EVANS [121], MATHIES, GAEBLER et PALM [131]). L'hormone lactogène est sans action. L'ACTH diminue la phosphatase du plasma (LI et Coll.).

c) *Thyroïde.*

Au cours des hyperthyroïdies pathologiques (KAY et ROBERTS [103, 154], VERMEHREN [196], BUCH [24], DUDLER [58], BECHGAARD [17] et expérimentales (SCOZ et MARANGONI, SOULAIRAC, DESCLAUX et TEYSSEYRE [182], DRILL, BOYD et SHAFFER [54]), il existe une hyperphosphatasémie plus ou moins nette et pas absolument constante. Alors que la phosphatase osseuse n'augmente pas ou diminue (LOW et AUB [124], FUJITA [70], de LUCA [125]) et que la phosphatase intestinale subirait une élévation de 30 p. 100 (PONZ [152]), l'hyperphosphatasémie pourrait être due soit aux lésions osseuses, soit à des lésions hépatiques (DRILL et Coll.) soit à l'intestin.

Au cours du myxœdème de l'adulte la phosphatasémie est normale alors qu'elle est basse chez les crétins jeunes (SMITH [179], TALBOT et Coll. [184], HILL et WEBBER [91]. De même au cours du myxœdème, les phosphatases osseuses et sériques sont basses (De CERA [38]).

d) *Parathyroïde.*

Nous avons signalé déjà l'hyperphosphatasémie de l'hyperparathyroïdie. Bien qu'elle soit généralement con-

sidérée comme d'origine osseuse, BONELLI et GALA [22] pensent que l'hormone a une action directe sur la phosphatase du rein.

e) *Thymus.*

Chez le lapin, la phosphatasémie augmente après thy-mectomie (de CERA) et chez l'homme, baisse après injection d'extrait thymique (d'ALESSANDRIA [5]).

f) *Médiateurs chimiques d'origine nerveuse.*

La phosphatase alcaline augmente après injection d'adrénaline, et diminue après injection d'acétylcholine. Les variations ne dépassent pas les limites de la normalité et disparaissent en 2 heures (PELOSIO et FIORE).

g) *Choc et réaction d'alarme.*

Au cours de la réaction d'alarme, la phosphatase du foie, des poumons, de la rate, des ganglions et du thymus augmentent contrairement à celle du rein qui ne varie pas. Les variations sont parallèles à celles du métabolisme (HERLANT et TIMIRAS [90]).

Après électro-choc chez le chien, la phosphatase diminue pendant 6 à 11 heures puis augmente pour redevenir normale à la 24^e heure (TROGANIELLO [191]).

9°) LEUCOCYTES.

Les leucocytes contiennent une phosphatase alcaline (ROCHE [156], CANTAROW [29], ALBERS [4]) qui se trouve seulement dans les polynucléaires neutrophiles. La phosphatasémie est augmentée dans les leucémies mais cette constatation ne suffit pas à affirmer la participation des leucocytes à la phosphatase sanguine car dans cette maladie existent de nombreux désordres tissulaires et en particulier osseux et hépatiques.

10°) AUTRES TISSUS.

Nous n'insisterons pas sur les phosphatases du muscle de la peau, du tissu nerveux qui ne semblent avoir aucun

rapport avec celle du sérum (littérature dans H. BAUR [16]).

Malgré sa complexité, cette analyse bibliographique permet quelques conclusions :

La phosphatase du sérum paraît tirer son origine de plusieurs tissus. Le rôle de l'os et de l'intestin est très probable, et l'importance relative de ces deux organes est variable selon les espèces. Celui du foie, du rein, de l'utérus et du placenta, de la glande mammaire, des polynucléaires neutrophiles est possible, mais il reste à prouver, et semble en tout cas secondaire.

Cette phosphatase continuellement déversée dans le sang est éliminée par le foie. Il semble plus probable mais non démontré qu'il s'agisse là d'une destruction plutôt que d'une excrétion biliaire. Le pancréas joue peut-être un rôle analogue mais très secondaire, exclusivement chez le chien. Par contre, les reins n'ont aucune action (sauf peut-être chez le chat).

Il ne semble pas exister à proprement parler de mécanisme régulateur de la phosphatasémie si l'on entend par là que le trouble à corriger est l'excitant spécifique du mécanisme correcteur. En effet, la phosphatasémie normale varie dans de larges limites que multiplient les troubles pathologiques. Il semble que la destruction ou l'excrétion hépatique étant relativement constante, toute hyperproduction (essentiellement osseuse ou intestinale) puisse retentir immédiatement sur le taux de l'enzyme. Les actions hormonales paraissent généralement peu marquées ou indirectes (action sur l'os surtout). Au total, la phosphatasémie normale reflètera surtout le taux de production, osseuse ou intestinale.

Cette absence de régulation se conçoit d'ailleurs si l'on considère que la phosphatase sérique paraît être surtout une substance en transit dans le sang, physiologiquement peu active ou tout au moins que son augmentation, même considérable ne paraît pas être cause de troubles métabo-

liques. Son cas est probablement analogue à celui d'autres ferments tels que la lipase ou l'amylase, et opposé à celui des métabolites ou des électrolytes dont le taux sanguin est maintenu dans des limites étroites par des mécanismes complexes.

DEUXIÈME PARTIE.

RECHERCHES PERSONNELLES.

TECHNIQUES ANALYTIQUES.

La nécessité, développée au début de ce travail, d'opérer dans des conditions strictement identiques pour obtenir des résultats comparables, nous a amené à choisir un protocole expérimental que nous avons conservé pour toutes nos observations.

1. — Protocole général des expériences d'hydrolyse.

Préparation des phosphatases. — Nous avons utilisé divers organes de chien : muqueuse intestinale, foie, rein, os de fœtus, préparés selon une technique dérivée de celle de ALBERS et ALBERS [3] : le broyat d'organes est autolysé 12 à 72 heures à la température du laboratoire après mélange avec un poids égal d'acétone à 20 p. 100 et addition de 1/20° d'acétate d'éthyle et de 1/20° de toluène. Le produit est ensuite filtré sur papier. Le filtrat limpide est précipité à -3° centigrade par l'addition d'acétone en versant goutte à goutte jusqu'à concentration de 60 p. 100 en acétone. Le précipité ainsi obtenu est redissout dans un volume d'eau bidistillée égal au 1/5° du poids initial de tissus. Une certaine quantité, variable selon les tissus et les expériences ne se redissout pas. Elle est éliminée par centrifugation. La solution est conservée dans un réfrigérateur à 3° . Dans les quelques jours qui suivent, l'activité augmente légèrement, et il se produit un léger précipité que l'on élimine. A partir de ce moment, l'activité est très stable pendant au moins 10 mois pour l'intestin, le rein et l'os, pendant un temps parfois inférieur mais toujours de plusieurs semaines pour le foie.

Tampon. — Nous avons utilisé une solution de véronal sodique Merck au R. P. à 22,8 p. 1000, acidifiée selon les besoins par de l'acide acétique M. La solution a été préparée extemporanément pour chaque expérience, de manière à éviter la carbonatation qui, nous l'avons vu, modifie l'activité et l'affinité.

Substrat. — Nous avons eu recours au β glycérophosphate O. Bailly et nous tenons à ce propos à remercier Monsieur BAILLY qui nous a fourni aimablement ce produit.

La solution M/10 a été pour chaque expérience ajustée au pH du tampon par adjonction de soude décinormale.

Effecteurs. — L'influence du magnésium sur la constante d'affinité nous a amenés à pratiquer nos hydrolyses avec une concentration M/250 de sulfate de magnésium.

Température. — La température a été fixée à $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$.

Durée de l'hydrolyse. — Nos hydrolyses ont le plus souvent duré 20 à 25 minutes, l'activité de la préparation étant ajustée par dilution appropriée. Cependant, nous avons vérifié qu'entre 5 et 120 minutes la durée d'hydrolyse n'affectait pas la valeur de KM. Aussi pour les expériences portant sur le sérum qu'il est nécessaire d'étudier à la même dilution, les temps d'hydrolyse ont largement varié dans ces limites de manière à conserver une valeur fixe à la quantité de glycérophosphate hydrolysé pour une même concentration en substrat, malgré les variations de la phosphatasémie.

Pourcentage de l'hydrolyse. — Comme COURTOIS, nous nous sommes contentés de ne pas hydrolyser plus du 1/10^e du glycérophosphate. Nous avons d'ailleurs constaté qu'au-dessous de ce taux il n'existe pas de variation sensible de KM.

Au total nous avons pratiqué nos hydrolyses de la

manière suivante, dans des séries de tubes à essai fins et longs gradués à 10 et à 20 cm³ :

Véronal sodique à 22,8 p. 1000.....	4	cm ³
SO ⁴ Mg M/25	1	cm ³
β glycérophosphate de soude $\frac{M}{10}$ tamponné.....	q. s.	
Eau bidistillée	q.s.p.	9,5 cm ³

le tube est agité puis mis pendant 10 minutes ainsi que la solution enzymatique au bain-marie à 37°. On ajoute alors 0,5 cm³ de la solution enzymatique et l'on agite encore une fois. Nous avons vérifié que l'agitation ne faisait pas baisser sensiblement la température.

L'hydrolyse est arrêtée avec 1 cm³ d'acide sulfurique à 30 p. 100 en volume si la préparation enzymatique est très purifiée. Dans le cas contraire, on déprotéinise avec 2 cm³ d'acide trichloracétique à 20 p. 100 en poids et 1 cm³ d'acide sulfurique à 30 p. 100. Dans ce dernier cas, on filtre sur papier sans cendre, de 90 m/m. et l'on rince trois fois avec 1,5 cm³ d'acide trichloracétique à 2 p. 100.

2. — Mesure du pH.

Le pH a été mesuré sur des tubes témoins contenant respectivement la plus forte et la plus faible concentration de glycérophosphate avec le pHmètre de Cambridge à l'électrode de verre. L'appareil était étalonné avec un tampon acéto-acétique et vérifié avec un tampon borate de soude-soude, préparé extemporanément avec de l'acide borique R.P. recristallisé 5 fois et desséché. Dans ces conditions, il est possible de mesurer avec une précision satisfaisante le 1/100^e de division. Comme nos mesures étaient faites à 17° et nos hydrolyses à 37°, il était nécessaire d'apporter un facteur de correction. Nos mesures nous ont permis de déterminer que pour le système de tampon utilisé une élévation de 1° centigrade entraînait un abaissement de pH de 0,01. Comme nous avons utilisé directement les mesures faites à 17° il est nécessaire pour obtenir le pH réel, d'apporter une correction de

— 0,2 pour chaque mesure. De plus, pour la plupart des expériences le pH a été mesuré sur deux séries de prises d'essai : au début et en fin d'expérience. Nous avons pu constater que malgré le faible pouvoir tampon du véronal sodique, le pH ne s'abaissait pas de manière appréciable pendant la durée de l'hydrolyse.

3. — Dosage de l'ion phosphate.

Nous avons utilisé une technique voisine de celle de BRIGGS. La solution limpide, refroidie à la température du laboratoire, et déjà acidifiée par 1 cm³ d'acide sulfurique à 30 p. 100 est complétée dans l'ordre suivant par 1 cm³ de solution d'hydroquinone fraîche (dissoudre 10 g de sulfite de soude anhydre à chaud, laisser refroidir, ajouter 0,50 g d'hydroquinone et compléter à 100 cm³), et 1 cm³ de molybdate d'ammonium à 10 p. 100. Compléter avec de l'eau distillée à 20 cm³. Les lectures sont pratiquées au bout de 20 ou 30 minutes selon l'intensité de la coloration. Il est possible, dans ce cas, d'apprécier de manière satisfaisante des différences de 1 γ de phosphore et avec une précision relative des différences de 0,5 γ.

Il est indispensable que la concentration en β glycérophosphate ne dépasse pas M/100 car au-dessus de ce taux, ce produit inhibe la coloration.

De plus, comme après adjonction d'acide sulfurique, le glycérophosphate subit une légère hydrolyse spontanée (1 à 4 γ pour 10 cm³ de β glycérophosphate M/50), il est nécessaire d'apprécier pour chaque expérience la quantité de phosphore spontanément libérée par le glycérophosphate.

CHAPITRE I.

ÉTUDE DES VARIATIONS DE KM SELON LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Le but de ce travail est l'étude de la spécificité des phosphomonoestérases alcalines selon le tissu dont elles proviennent et la nature de la phosphatase du sérum.

L'analyse de la bibliographie permet, nous l'avons vu, de penser que la constante d'affinité représente une valeur plus spécifique que l'action des effecteurs ou le pH optimum. Il ressort cependant des travaux antérieurs que de nombreux facteurs sont susceptibles de faire varier KM. Il était donc nécessaire, avant d'affirmer que des différences appréciables de KM traduisaient la nature différente des enzymes tissulaires, de faire une étude cinétique précise des phosphatases, et de rechercher si les facteurs de variation pouvaient être éliminés.

Notre étude cinétique a porté sur la phosphatase intestinale. Nous avons cherché à préciser l'action du pH, du degré de pureté et du vieillissement de la solution enzymatique et enfin du magnésium.

A. — Variation en fonction du pH.

Nous avons choisi comme matériel d'étude l'extrait purifié d'intestin de chien, et nous avons déterminé KM à des pH variant de 8,23 à 9,92. Nous rappelons que ces valeurs de pH sont, pour des raisons de commodité, données à une température de 17°. Pour les ramener au pH réel de la température d'hydrolyse (37°) on peut, sans

commettre d'erreur importante, soustraire 0,20 du chiffre que nous indiquons dans le tableau II.

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau I le détail de 6 expériences pratiquées à des pH différents.

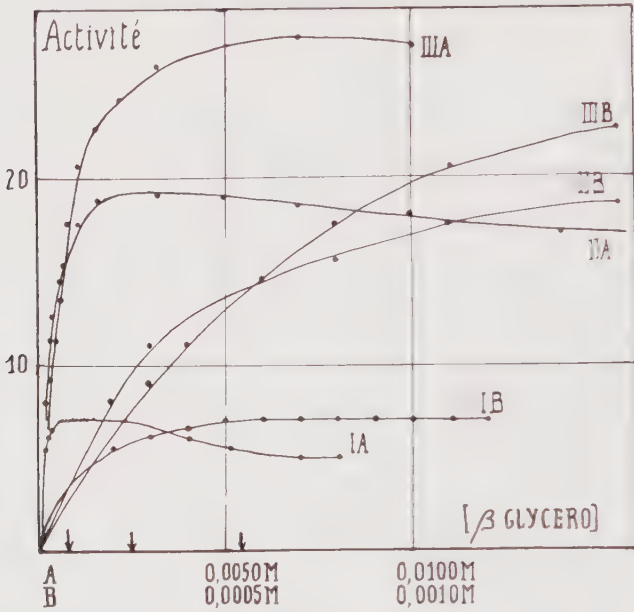


FIGURE 1.

En ordonnée la vitesse d'hydrolyse en γ de P. libéré.

En abscisse la concentration en β glycérophosphate à 2 échelles :

— pour I_A , II_A , III_A , 0,005 à 0,020 M.

— pour I_B , II_B , III_B , 0,0005 à 0,0020 M.

On a donc figuré chaque courbe à 2 échelles pour donner à la fois l'allure générale de la courbe et avec précision sa partie inférieure :

I pH =	8.23	KM =	14.000
II pH =	9.05	KM =	4.000
III pH =	9.26	KM =	1.850

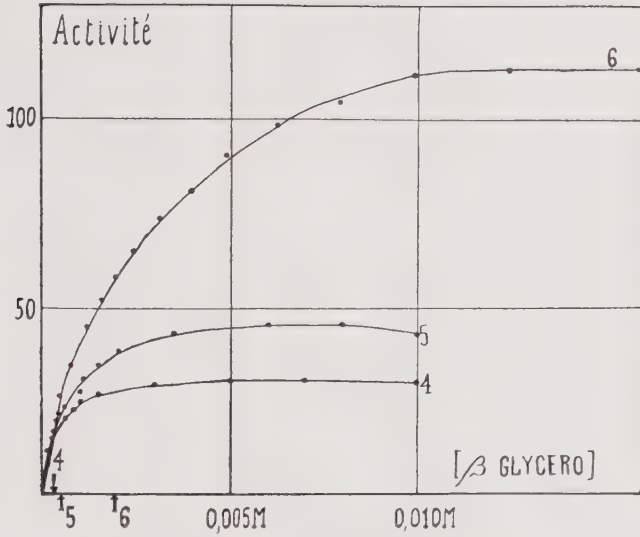


FIGURE 2.

En ordonnée : vitesse d'hydrolyse en γ de P. libéré.

En abscisse : concentration en β glycérophosphate M.

Les courbes nous donnent

KM 4	1.580	pH 9.36
KM 5	1.000	pH 9.56
KM 6	260	pH 9.92

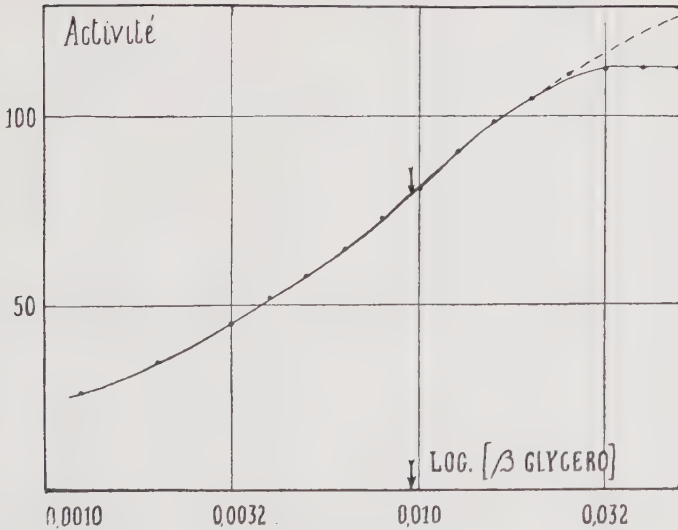


FIGURE 3.

pH 9.92 (intestin).

En ordonnées : vitesse d'hydrolyse en γ de P. libéré.

En abscisses : concentration log. ($[\beta$ glycérophosphate M) $\times 1000$.

TABLEAU I.

Exemple de calcul de la constante d'affinité
de la phosphatase intestinale à différents pH.

β. glycéro- phosphate M	Vitesses d'hydrolyses en γ de P					
	pH 8,23 à 17°	pH 9,06 à 17°	pH 9,26 à 17°	pH 9,36 à 17°	pH 9,56 à 17°	pH 9,92 à 17°
0,0002	5,5	8				
0,0003	6	11	9			
0,0004	6,5	12,5	11	12		
0,0005	7					
0,0006	7	14,5	14,5	15	16,5	
0,0007	7					
0,0008	7	15,5	17,5	17	19,5	
0,0009	7					
0,0010	7				21,5	26,5
0,0011	7	17,5	20,5			
0,0012	7			20,5	23	
0,0016		18,5	22,5	23	27	35
0,0020	7			25		
0,0022		19	24		30	
0,0025						45
0,0030				26,5	34	
0,0032		19	26			52
0,0040	6				38,5	58
0,0050		19	27			65
0,0060				29		
0,0063						73,5
0,0070	5	18,5	27,5		43	
0,0080						81
0,0100	5	18	26	30,5		91
0,0120					45	
0,0126						98,5
0,014		17		30,5		
0,016					45	105
0,020		16		29,5	43,5	112
0,025						113
0,032						113
0,040						113

TABLEAU II.

Constante d'affinité de la phosphatase intestinale
en fonction du pH.

pH à 17°	N° de l'extrait	KM déterminé arithmétiquement	KM déterminé logarithmi- quement
8,23	1 ₀	13.500	
8,23	1 ₀	14.000	
8,87	1 ₀	6.300	
9,02	1 ₂	4.760	
9,02	1 ₃	4.760	
9,06	1 ₃	4.000	
9,10	1 ₂	3.700	
9,14	1 ₃	3.000	
9,15	1 ₀	2.850	
9,17	1 ₂	2.560	
9,18	1 ₀	2.300	
9,18	1 ₂	2.320	
9,25	1 ₀	1.950	
9,26	1 ₃	1.850	1.400
9,29	1 ₂	1.700	1.250
9,30	1 ₀	1.800	
9,35	1 ₁	1.580	
9,36	1 ₂	1.580	1.000
9,43	1 ₀	1.400	900
9,44	1 ₂	1.370	
9,50	1 ₂	1.000	
9,56	1 ₀	1.000	550
9,57	1 ₁	970	560
9,58	1 ₀		550

TABLEAU II (suite).

ph à 17°	N° de l'extrait	KM déterminé arithmétiquement	KM déterminé logarithmiquement
9,62	1 ₂		455
9,63	1 ₂	560	400
9,63	1 ₁	690	400
9,65	1 ₀		370
9,65	1 ₁		345
9,67	1 ₂		315
9,70	1 ₀		273
9,73	1 ₀		250
9,75	1 ₀		230
9,80	1 ₂		200
9,83	1 ₀		160
9,92	1 ₀	260	130

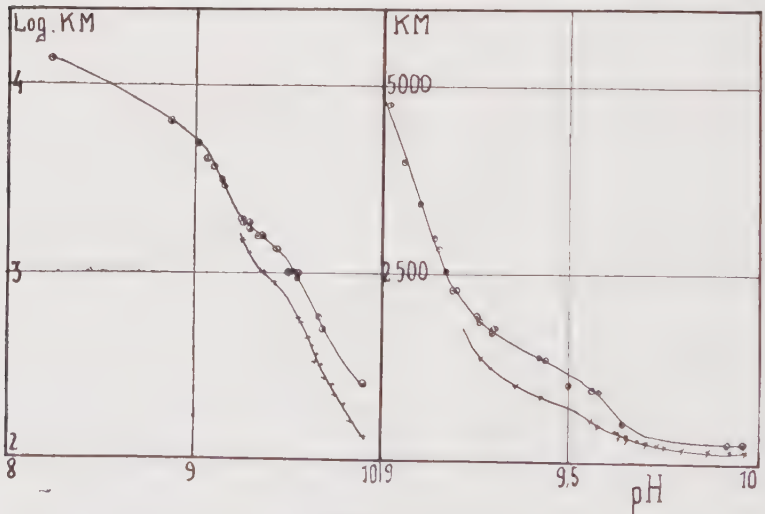


FIGURE 4.

Variation de KM (intestin) en fonction du pH.

- — ○ : KM déterminé par la méthode de Von EULER et LAURIN.
 x — x : KM déterminé par la méthode de MICHAËLIS et MENTEN.

1°) DÉTERMINATION DE KM ET FORMATION
D'UN COMPLEXE ES_2

La formation d'un complexe ES_2 à partir d'une certaine concentration de substrat pourrait rendre inexacte la technique de VON EULER et LAURIN dans laquelle on porte en abscisse les valeurs arithmétiques de S. En effet, dans ce cas, il est impossible de déterminer la vitesse maxima théorique. Il ressort de l'examen des 6 courbes des figures 1 et 2 que le composé ES_2 se forme quel que soit le pH, tout au moins dans les limites que nous avons étudiées (pH 8.23 à 9.92). Il semble même évident qu'il prenne naissance à des concentrations en substrat d'autant plus faibles que le pH est plus acide. Cependant, la vitesse maxima étant aussi d'autant plus rapidement atteinte que le pH est plus bas, l'examen de nos courbes montre que la méthode de VON EULER et LAURIN est satisfaisante dans la zone la moins alcaline.

Des conclusions identiques peuvent être tirées de la figure et du tableau IV. En effet, dans les zones de pH où nous avons pu mener de front les deux méthodes, celle de MICHAËLIS et MENTEN donne une valeur de KM (KM (log.)) inférieure à celle de VON EULER et LAURIN (KM (Ar)). Il est donc évident que dans cette zone (au-dessus de pH 9.26) le composé ES_2 se forme avant que ne soit atteinte la vitesse maxima théorique. Cependant, il faut remarquer que le pourcentage d'erreur donné par la mesure de KM (Ar), mesuré par la différence Log. KM (Ar)-Log KM (log.) est d'autant plus faible que le pH est moins alcalin : 0,12 à pH 9.26 et 0,30 à pH 9.92. Au-dessous de pH 9.26 il ne nous a pas été possible de calculer KM (log) pour des raisons techniques : en effet, la nécessité de ne libérer que de très petites quantités de phosphate pour rester en vitesse initiale ne permet pas de déterminer la partie inférieure de la courbe. Cependant, si l'on extrapole vers les pH moins alcalins la courbe de KM (log) il semble que celle-ci se confonde avec KM (Aa) entre pH 9.10 et 9.20. C'est donc seulement

au-dessous de ces pH que la méthode de VON EULER et LAURIN peut vraisemblablement être tenue pour exacte.

Cependant il faut remarquer que cette dernière fournit au moins jusqu'à pH 9.50 des résultats, sinon exacts, du moins très cohérents. Ceci semble indiquer que la formation de ES_2 ne reconnaît comme seule condition variable que le pH, c'est-à-dire qu'elle ne dépend ni de l'activité, ni de l'enzyme, ni de son degré de purification (dans les conditions de nos expériences tout au moins).

Entre pH 9.10 (probablement) et pH 9.50 (au moins), KM (Ar) ne représente donc pas l'inverse de la constante de dissociation KM de l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$, mais la résultante de cet équilibre et de $E + 2 S \rightleftharpoons ES_2$. Ceci dit, cette valeur ne variant qu'avec le pH et restant indépendante du degré de pureté ou d'activité, elle paraît représenter comme KM une constante caractéristique de l'enzyme. Aussi, dans la suite de ce travail nous utiliserons KM (Ar) au-dessous de pH 9.50 pour des raisons de commodité (analyse des courbes plus facile et plus exacte dans ces conditions), sachant que cette valeur est probablement identique à $1/KM$ au-dessous de pH 9.10, qu'elle lui est supérieure au-dessus, mais qu'elle est alors également caractéristique.

2°) ETUDE DES VARIATIONS DE KM EN FONCTION DU pH. INTERPRÉTATION.

Comme JACOBSEN nous avons constaté que KM diminue très rapidement quand le pH augmente. Comme nous l'avons vu dans la première partie, cette relation explique que le pH optimum se déplace vers la neutralité d'autant plus que la concentration en substrat est plus faible. Ceci détruit le paradoxe d'un enzyme actif seulement à des pH qui ne sont jamais atteints dans l'organisme.

Les nombreuses déterminations que nous avons pratiquées nous permettent de préciser plus exactement la courbe KM f (pH). Contrairement aux conclusions de

Courtois déjà critiquées dans la première partie, la relation $\log KM f(pH)$ n'est pas une droite. Cette constatation ressortait déjà à l'analyse des chiffres de JACOBSEN. La courbe s'infléchit à ses deux extrémités et il est possible qu'elle possède deux asymptotes parallèles à l'axe des abscisses. Mais le caractère le plus frappant est la double inflexion qu'elle présente entre pH 9.20 et 9.60.

Dans une étude préliminaire (J. ROCHE et H. SARLES) nous avons réuni en une même courbe : $KM (Ar)$ aux pH inférieurs à 9.50 et $KM (\log)$ aux pH supérieurs à 9.50, ce qui exagérerait artificiellement les inflexions de celle-ci. Cependant le fait qu'elles existent nettement aussi bien sur la courbe $KM (Ar)$ poursuivie jusqu'à pH 9.92 que sur celle de $KM (\log)$ partant de 9.26, montre qu'il ne s'agit pas d'un artefact dû à la juxtaposition de valeurs obtenues par des méthodes différentes.

Notre première interprétation avait été que cet aspect était suggestif d'un mélange de deux enzymes en proportions assez constantes et probablement en équilibre l'un avec l'autre. Cette hypothèse avait déjà été soutenue par CLOETENS à partir d'arguments de valeur discutable. Plus récemment, GOMORI a suggéré l'existence dans la phosphatase rénale de 3 constituants différents X, Y et Z, pouvant partiellement se transformer l'un en l'autre. Bien qu'elle ne puisse être rejetée catégoriquement, cette opinion ne nous paraît plus actuellement satisfaisante. En effet, les diverses fractions de GOMORI, si tant est qu'elles existent réellement sont inégalement stables et leurs proportions respectives varient avec le vieillissement. Or, comme nous le verrons par la suite, le vieillissement ne modifie aucunement la valeur de KM .

Aussi, pensons-nous plutôt qu'il existe des facteurs modifiant l'affinité au voisinage de pH 9.1-9.2, et 9.5-9.6. Ces valeurs correspondent au pK de groupements basiques que leur dissociation permet d'individualiser sur les courbes de titration de nombreuses protéines. Aussi, l'hypothèse de la participation de groupements basiques de l'apoenzyme à la fixation du substrat mérite-t-elle

d'être retenue. En outre, la valeur très réduite de la constante d'affinité au pH optimum (pH 9.9) illustre l'indépendance du groupement actif de la cophosphatase et du groupement de l'apoenzyme protéique se combinant au substrat.

B. — Relation de km et du degré de pureté de la phosphatase.

Nos déterminations ont été faites avec 4 extraits préparés selon la technique déjà signalée : I_0 , I_1 , I_2 , I_3 . Les temps d'autolyse ont intentionnellement varié de 12 à 72 h. et l'activité de 300 à 1.200 γ par mg. d'azote et par minute. De plus, nous avons utilisé un 5^e extrait I_c préparé par S. BOUCHILLOUX, dialysé contre eau bidistillée, réactivé avec du magnésium et d'activité voisine de 10.000. Les nombreuses déterminations de KM faites avec ces diverses préparations ont montré que quel que soit le lot d'enzymes, l'affinité était identique pour le même pH. Enfin, nous avons au cours de la même expérience déterminé l'affinité à pH 9.30, d'un enzyme très purifié, préparé par S. BOUCHILLOUX (activité 21.000) : I_p et contenant uniquement deux protéines à l'électrophorèse, et d'autre part d'un simple autolysat de muqueuses dans l'eau distillée I_n , nous avons trouvé :

pH 9.30	{	I_n	KM	1.660
		I_p	KM	1.780

la valeur obtenue pour la phosphatase purifiée se situe très exactement sur la courbe I. La valeur de KM pour l'autolysat est très légèrement supérieure, mais la différence est très faible et n'est peut-être pas supérieure à la précision de la méthode. Il semble donc que ni la purification, ni la dialyse ne modifient notablement l'affinité de la phosphatase de l'intestin de chien, tout au moins à partir d'un certain degré de purification.

C. — Relation entre l'affinité et le vieillissement de l'enzyme.

Il ne semble pas que le vieillissement prolongé de la phosphatase intestinale à la glacière à 3°, malgré de longs séjours à la température du laboratoire pendant

TABLEAU III.

Calcul de l'affinité de la phosphatase intestinale en présence ou en l'absence de magnésium.

β glycerophosphate M	Activité en γ de P.					
	9,17		9,50		9,67	
	sans Mg	avec Mg	sans Mg	avec Mg	sans Mg	avec Mg
0,0032	7,5	9,5				
0,0040	8,5	10,5				
0,0005	9,5	11,5	6	7,25	6,50	7
0,0006			7	8,5		
0,00063	10,5	13				
0,00080	11	14	8	8,75	8	10
0,0010	12	15	9	11,75	11	13,5
0,00126	11	13,5				
0,0016	12,5	17,5	11	14,25		
0,0020	13	18,5			12,5	17
0,0025	13	18,5	12,5	17	13,5	18,5
0,0032					14,5	20
0,0040	13,5	19,5	13,5	20	15	21
0,0060	13,5	20	14	22		
0,0063					16,5	23,5
0,01	13	20,5	14,5	22,5	17,5	24,5
0,016			15	23,25	18	
0,02			15	23,25	18	24,5

la durée des expériences, modifie l'activité, pas plus d'ailleurs que l'affinité. En effet, la détermination de I_0 à pH 9.43 a été faite le 25.4.1950, celle de l' I_0 à pH 9.44 le 14.12.1950. Nous avons obtenu pour KM les valeurs de 1.400 et 1.370 (la différence légère s'expliquant par la variation du pH). On peut donc conclure que cet extrait préparé le 5.12.49 n'a pas, pendant une année modifié son affinité. Ceci atteste la grande stabilité de l'enzyme intestinal.

D. — Relation entre l'affinité et la concentration en magnésium.

Nous avons étudié l'action de Mg^{++} sur l'enzyme I_e très purifié et dialysé contre eau bidistillée aux pH 9.17, 9.50 et 9.67.

TABLEAU IV.
Action du magnésium sur KM.

pH à 47°	(Protocole habituel (Mg M/250))	Sans Mg
9,17	2.560	4.000
9,50	1.000	1.400
9,67	315	400

Nous confirmons donc que le magnésium diminue l'affinité, bien qu'il augmente l'activité. Il faut d'ailleurs remarquer que l'abaissement relatif de KM (exprimé par la différence Log KM sans Mg-Log KM avec Mg) est d'autant plus grand que le pH est plus alcalin : 0, 10 à pH 9.67, 0,146 à pH 9.50 et 0,2 à pH 9.67.

RÉSUMÉ DU PREMIER CHAPITRE.

1°) Nous confirmons les fortes variations de l'activité selon le pH avec une rapide baisse vers les pH alcalins.

La courbe KM f (pH) présente deux inflexions qui cor-

respondent peut-être à la participation des groupements basique la l'apoenzyme à la fixation du substrat.

2°) Comme KM, la formation du complexe ES_2 paraît être fonction du pH.

3°) Enfin, si le magnésium diminue l'affinité bien qu'il augmente l'activité, le vieillissement et le degré de purification de la préparation enzymatique sont sans influence sur la valeur de KM pour un même pH.

CHAPITRE II.

CONSTANTES D'AFFINITÉ DE DIVERS ORGANES (FOIE, INTESTIN, REIN, OS), ET SPÉCIFICITÉ TISSULAIRE DES PHOSPHOMONOESTÉRASES ALCALINES.

L'étude cinétique de la phosphatase intestinale que nous avons faite au chapitre I a confirmé que l'activité variait considérablement avec le pH, et de manière moins importante, mais encore très appréciable avec la concentration en magnésium. Il est donc nécessaire, pour pouvoir comparer la constante de MICHAËLIS de divers enzymes, de déterminer très exactement le pH de l'expérience, et de travailler sous une concentration constante en magnésium. Dans ces conditions, la seule cause d'erreur que l'on ne puisse éliminer réside dans la présence possible d'effecteurs concurrents dans les extraits étudiés. Cependant, le degré de purification des phosphatases employées rend cette cause d'erreurs peu probable. Aussi, nous sommes-nous crus autorisés à comparer à divers pH l'affinité des phosphatases du foie du rein et de l'os avec celle de l'intestin.

A. — Foie, rein et intestin d'animaux adultes.

Nous avons déterminé l'affinité de la phosphatase de foie et de rein à divers pH (9 à 9.92) de manière à comparer les courbes KM f (pH) de ces organes avec celle de l'intestin, déjà étudiée plus haut. Pour éviter toute

TABLEAU V.

Calcul de la constante d'affinité du foie
à divers pH.

Activité en γ de P.

β glyceroph. M	Activité en γ de P.			
	9,01	9,21	9,36	9,65
0,0002	8,25			
0,0003	11,5			3,75
0,0004	12,5	8	7,5	4,25
0,0005				4,75
0,0006	13,75	9,5	9,5	5,5
0,0008	14,75	10,5	11,5	6,25
0,0011	15,5	11,5	13,5	7
0,0016	16	12,25	15,5	8,25
0,0022	16,25	12,75	17	9,25
0,0032	16,25	13,25	18	10,5
0,0040				11,25
0,0050	16,25	13,75	19	12
0,0060				12,5
0,0070	16,25	14	20	13
0,01	15,75	13,75	21	13,75
0,014		13,5	21	14,25
0,016			21	14,5
0,02			21	15

(Les résultats donnés au 1/4 de γ sont dus à ce que, aux mesures faites au γ ou au 1/2 γ près on a soustrait la quantité de phosphore contenu pour chaque concentration dans le glycérophosphate).

TABLEAU VI.

Variation de l'affinité de la phosphatase hépatique
en fonction du pH.

pH à 17°	N° de l'extrait	KM (Ar)	KM (log)
9,01	F. 2	5.500	
9,21	F. 1	3.300	
9,21	F. 2	3.300	
9,23	F. 1	2.500	
9,23	F. 0	2.500	
9,37	F. 1	1.500	1.250
9,37	F. 2	1.500	1.250
9,47	F. 1	1.270	800
9,62	F. 2		645
9,63	F. 1		620
9,65	F. 0	770	562
9,80	F. 1		300

cause d'erreur dans la mesure du pH, la plupart des déterminations de KM ont été couplées, de manière à déterminer dans la même expérience et avec le même tampon la valeur de KM pour deux ou trois de ces organes. Les extraits intestinaux utilisés, très actifs, ne modifient pas le pH du tampon. Il en est pratiquement de même pour le rein. Par contre, les extraits hépatiques moins actifs entraînent généralement un abaissement de 0,02 à 0,04 dont il a été tenu compte pour chaque expérience.

TABLEAU VII.

Exemple de calcul de la constante d'affinité du rein
à divers pH.

β glyceroph. M	Activité en γ de P.			
	9,01	9,35	9,45	9,58
0,0002	6,5			
0,0003	8,5			
0,0004	10	14	10	11
0,0006	11,5	16,5	13	15
0,0007		17,5		17,5
0,0008	12,5	18	15,5	19
0,0010		20		22
0,0011	13		17,5	
0,0012		21		24
0,0016	13,25		20,5	
0,0020		23,5	22	31
0,0022	13,5			
0,0030				35
0,0032	13,5	26,5	24	
0,0040		27		37
0,0050	13,5		26	
0,0060		28,5		40
0,0070	13,25		26,5	
0,0080		28,5		
0,01	13	29	26,5	43
0,012		28,5		45
0,014		28	26	45
0,015				46
0,02			25	

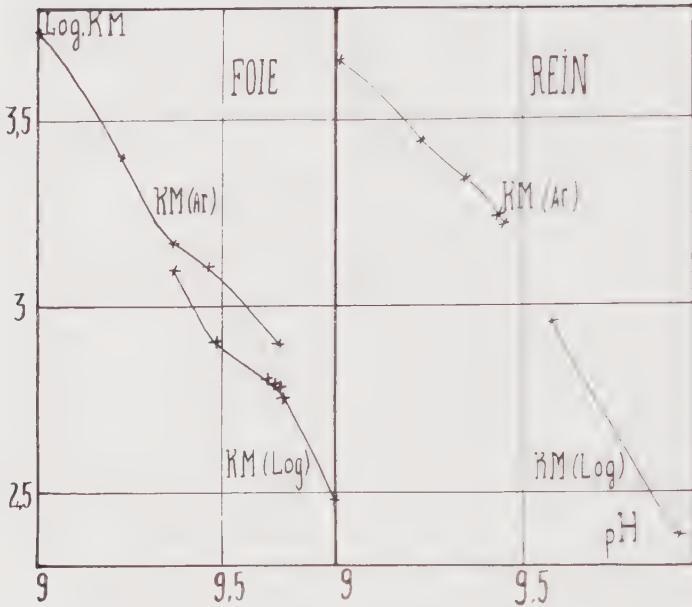


FIGURE 5.
Variations de l'affinité du Foie et du Rein
en fonction du pH.

TABLEAU VIII.
Variation de la constante d'affinité
de la phosphatase rénale en fonction du pH.

	Détermination de VON EULER					D. de MICHAELIS	
	9,01	9,23	9,35	9,44	9,45	9,58	9,92
pH à 17°....	9,01	9,23	9,35	9,44	9,45	9,58	9,92
N° extr.....	R.2	R.1	R.0	R.1	R.2	R.0	R.0
KM	4.550	2.800	2.200	1.750	1.560	900	240

Il est possible de faire pour le foie et le rein des remarques identiques à celles que nous avons faites pour l'intestin :

1°) Quel que soit le lot d'enzyme utilisé et malgré les différences importantes d'activité, la valeur de KM pour

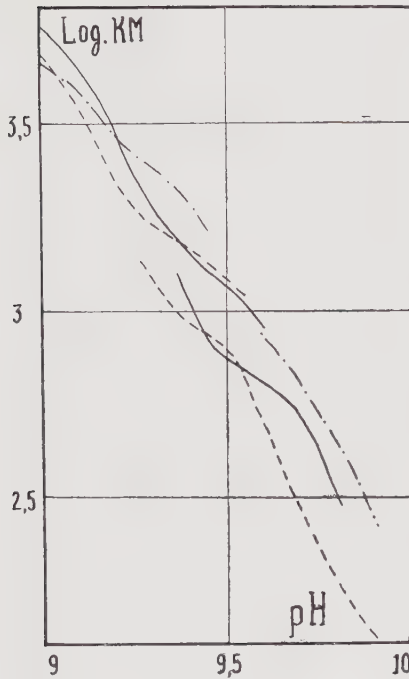


FIGURE 6.

Comparaison de la constante d'affinité du foie, du rein et de l'intestin en fonction du pH.

----- intestin
————— foie
- . - rein.

un pH déterminé est toujours la même pour la phosphatase d'un même organe. En particulier, nous avons comparé à pH 9.23 un extrait hépatique (F.I.) et un autre extrait purifié par fractionnement acétonique entre 30 et 50 p. 100 d'acétone (F.O.) : les résultats sont exactement superposables.

2°) L'allure générale de la courbe KM f (pH) est identique à celle de l'intestin et présente en particulier les mêmes inflexions. Cependant, celles-ci sont moins marquées pour la phosphatase rénale et situées à un pH un peu plus alcalin pour la phosphatase hépatique.

3°) Les différences entre KM (Ar) et KM (log) paraissent identiques pour le foie à ce qu'elles ont été trouvées pour l'intestin. Les deux courbes paraissent devoir se confondre pour les pH inférieurs à 9.30.

4°) Les différences d'affinité d'un enzyme à l'autre sont importantes et dépassent certainement les erreurs d'expériences (fig. 6). Cependant, remarquons que les courbes se coupent en plusieurs points, aussi est-il nécessaire de comparer l'affinité de deux enzymes à différents pH. On doit se demander dans quelle mesure ces différences permettent d'affiner la spécificité d'organe de ces diverses phosphatases : elles sont, sinon une preuve absolue, du moins très en faveur de celles-ci. En effet, nous avons, en choisissant un protocole très strict éliminé les principaux facteurs de variation de l'affinité (pH, température, tampon, substrat). D'autre part, la présence d'une concentration importante de magnésium dans toutes nos expériences permet d'éliminer une variation naturelle dans la concentration de ce métal.

Il reste pourtant une objection : c'est la présence dans nos extraits d'effecteurs modifiant l'affinité d'une manière variable d'un enzyme à l'autre. Il semble cependant que de forts arguments peuvent être opposés à cette hypothèse : ni la dialyse, ni le fractionnement acétonique, ni l'extrême purification ne modifient l'affinité.

B. — Constante d'affinité de la phosphatase d'os de fœtus.

La phosphatase sérique alcaline étant considérée par de nombreux auteurs comme d'origine essentiellement osseuse il était indispensable d'étudier l'affinité de l'enzyme de l'os.

Comme l'os de fœtus est beaucoup plus riche en phosphatase que l'os adulte nous avons utilisé pour nos expériences des fœtus de chiens prélevés *in utero* et âgés de 50 à 65 jours. Il ne nous a malheureusement pas été donné de trouver des fœtus de chiens plus jeunes. Aussi

pour étudier l'influence de l'âge, avons-nous comparé dans une deuxième série d'expériences les os d'un fœtus humain de trois mois et ceux d'un enfant de 2 ans. Les extraits ont été dans tous les cas préparés à partir de métaphyses, tibiales, fémorales et humérales soigneusement débarrassées des tissus mous et purifiés selon la technique employée pour les autres organes.

1°) VARIATION DE L'AFFINITÉ DE L'OS DE FŒTUS DE CHIEN
EN FONCTION DU pH ET COMPARAISON
AVEC LA PHOSPHATASE INTESTINALE.

L'âge des fœtus utilisés était environ le suivant : (estimation du vétérinaire) :

0.1	60 jours
0.2	60 jours
0.3	50 jours.

De manière à éviter les erreurs possibles dans la mesure du pH, nous avons chaque fois réuni en une seule expérience la détermination de KM pour une ou deux phosphatases osseuses et pour un échantillon de phosphatase intestinale prise comme étalon.

TABLEAU IX.
Variation de la constante d'affinité de la phosphatase
d'os de fœtus en fonction du pH.

n° expér.	Intestin.	0,1	0,2	0,3	pH à 17°
1	2.500	2.080	2.380		9,17
2		1.920	2.040	2.630	9,21
3	2.100	1.960	2.040		9,21
4	1.900	1.900	2.000		9,22
5	1.700	1.870			9,30
6	1.520		1.800	1.900	9,40
7		1.580	1.720		9,42
8	1.250	1.430	1.530		9,46

La valeur de KM a été calculée par la méthode de Von EULER et LAURIN.

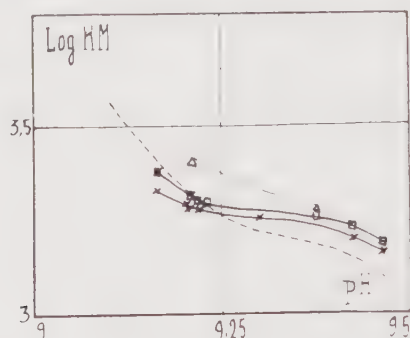


FIGURE 7.

K.M. — Os de fœtus de Chien.

Les valeurs de KM ont été calculées par la méthode de Von EULER et LAURIN.

x—x—x	0,1.
o—o—o	0,2.
Δ—Δ—Δ	0,3.
—	intestin.

On voit que les courbes KM f (pH) présentent la même allure générale que celles des autres organes étudiés et en particulier que la double inflexion signalée est encore plus nette.

Mais le fait très particulier est la différence notable d'affinité d'un fœtus à l'autre.

Cette différence nous paraît devoir être interprétée de la manière suivante :

a) Elle n'est pas due à la présence d'un inhibiteur concurrentiel dialysable mélangé en proportion variable à l'enzyme. En effet, nous avons dialysé pendant 12 heures une solution de l'extrait 0,1 contre une solution de 0,2 avant toute expérience. Dans un deuxième temps nous avons déterminé au cours de la même expérience à pH 9,42 le KM de ces deux phosphatases ainsi dialysées. Comme on peut le voir sur la figure 7, il n'en est résulté aucune variation en particulier, aucune égalisation de KM pour ces deux préparations.

b) Il ne peut s'agir d'une variation due au vieillissement, en effet, pour les trois extraits les dates d'utilisation ont varié de 4 à 45 jours après la préparation sans différences notables de l'affinité.

c) Il semble donc s'agir d'une différence portant sur la nature de ces enzymes. Comme il n'est pas possible d'envisager que chaque fœtus possède une phosphatase osseuse particulière, nous pensons que les différences doivent être expliquées par le mélange en proportion variable de deux phosphatases isodynmes. Si l'on considère que nos expériences ont porté sur des fœtus d'âge assez proche de la naissance (65^e jour), il devient vraisemblable qu'il existe une phosphatase osseuse fœtale progressivement remplacée par une phosphatase osseuse d'apparition plus tardive. Cette hypothèse est confirmée par la comparaison des trois courbes : les extraits 0,1 et 0,2 provenant de fœtus d'âges sensiblement identiques (60 jours environ) sont très voisins. Par contre, l'extrait 0,3 provenant d'un fœtus plus jeune présente une affinité notablement plus grande. Il est donc probable que le chien présente, au cours de son développement une phosphatase osseuse fœtale de très forte affinité, progressivement remplacée par un enzyme d'apparition plus tardive, et d'affinité plus faible dans les limites de pH étudiées. On sait d'ailleurs que l'étude de nombreuses protéines fœtales a montré qu'elles étaient différentes de celle de l'animal adulte.

2°) COMPARAISON DE L'AFFINITÉ DE L'OS DE FŒTUS HUMAIN ET DE L'OS D'ENFANT.

Au cours de cette expérience, le pH n'a pu être déterminé avec précision ($9,60 \pm 0,2$). Mais il était certainement identique pour les deux extraits étudiés. En effet, les déterminations ont été faites au cours de la même expérience (tampon identique) et la forte activité des extraits (on a utilisé des dilutions au 1/10.000 et au 1/24.000 de solutions limpides) permet d'affirmer que le pouvoir tampon propre à chacune était nul.

Nous avons obtenu les affinités suivantes :

Os de fœtus humain de 3 mois.....	K.M. 1.800
Os d'enfant de 3 ans	900

Cette expérience confirme donc les constatations faites sur le chien, la plus grande différence d'affinité étant certainement due à l'âge très différent des sujets.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE.

— Les phosphatases du foie, du rein et de l'intestin de chien adulte présentent chacune une affinité particulière pour le β glycérophosphate de soude, qui se traduit par des différences dans la valeur de KM a divers pH. Il est peu probable que ces variations soient dues à la présence d'effecteurs. Elles traduisent donc vraisemblablement une différence de nature des enzymes étudiés et confirment la notion de spécificité d'organe des phosphatases.

— Il semble que l'os de fœtus de chien, comme celui de l'homme contienne deux phosphatases. La première d'affinité très élevée apparaît précocement dans les premiers stades de l'ossification. Elle est progressivement remplacée au cours de l'évolution par une phosphatase d'affinité plus faible.

CHAPITRE III.

ÉTUDE CINÉTIQUE DU SÉRUM NORMAL ET HYPERPHOSPHATASÉMIQUE CHEZ LE CHIEN ET CHEZ L'HOMME.

Les expériences des Chapitres II et III nous ont montré que chaque tissu possédait une phosphatase particulière. Cette spécificité se traduit par des valeurs différentes de KM pour un même pH. Il est ainsi possible d'espérer que la détermination de l'affinité de la phosphatase plasmatique et sa comparaison avec celle de divers tissus permettra de préciser l'organe responsable de la phosphatasémie. Nous avons donc déterminé le KM du sérum à divers pH dans des conditions normales et au cours d'hyperphosphatasémies pathologiques. Cependant, la constatation faite par AEBI de variation de l'affinité selon que l'expérience est pratiquée en présence ou en l'absence de protéines plasmatiques — celles-ci se comportant comme des effecteurs — rendait discutable la comparaison de nos résultats portant sur une phosphatase tissulaire purifiée ou sur celle du plasma. Aussi avons-nous, à divers pH, déterminé l'affinité de mélanges de phosphatases hépatiques et intestinales et de sérum. Nous pensons ainsi pouvoir éliminer la cause d'erreur que représente l'existence possible d'effecteurs présents dans le sérum.

1. — **Sérum humain normal et hyperphosphatasémique.**

Nous avons commencé notre étude par la phosphatase alcaline du sérum humain normal et pathologique qui fournit une large gamme d'hyperphosphatasémie. Il nous a donc été facile de réunir, à côté de sérums normaux des hyperphosphatasémies osseuses (maladies de Paget) et ictériques.

TABLEAU X.

Exemples de calcul de l'affinité du sérum humain à divers pH.

β glycerophosph. M	Activité en γ de P		
	pH 9,21	pH 9,50	pH 9,60
0,0003	4	5	
0,0004	5	6,25	
0,0006	6,5	7,5	
0,0008	7	9	12
0,0010			14
0,0012	8,5	10,5	
0,0014			17
0,0016	9,5	11,25	
0,0020			21
0,0025	10	12,5	
0,0030			24,5
0,0040	11	13,25	
0,0050			28,5
0,0080	11	14	31
0,0120	11	14	34
0,0160			34,5
0,02			34,5

TABLEAU XI.
Constante d'affinité de la phosphatase du sérum humain
à divers pH.

Observation	Activité	KM (Ar)	KM (log)
pH 9,21 à 17°			
Normal	11,5	2.500	
Normal	11,5	2.500	
Normal	13	2.500	
pH 9,30 à 17°			
Normal	16,5	1.900	1.660
Mal. de Paget	63	1.900	
Ict. par rét.	103	2.100	1.730
Mal. de Paget	66	1.900	
Ict. par rét.	240	1.950	1.600
Normal	15	1.850	
Grippe	13	1.900	1.660
Normal	17	2.100	1.750
pH 9,60			
Normal	20	800	625
	23	770	625
Mal de Paget	136	715	625
Normal	20	830	625
Normal	40	770	657
Ict. par rét.	98	690	612
Ict. par rét.	106	800	630

L'activité a été calculée en γ de P. libérés par 0,5 cm³ de sérum en une heure.

On voit que l'affinité de la phosphatase sérique est identique aux erreurs d'expérience près, et pour une

même valeur de pH, quelle que soit l'origine du sérum. En particulier KM ne varie guère dans les hyperphosphatasémies d'origine osseuse ou hépatique et pour le sérum normal. Dans un travail préliminaire (ROCHE et SARLES [166]) nous avons trouvé des valeurs de KM variables selon l'activité mais non selon la provenance du sérum. Nous en avons conclu à la dualité de la phosphatase alcaline du sérum. Ces résultats provenaient en réalité de variation dans le pH d'une expérience à l'autre, variation que nous n'avions pu reconnaître en raison des conditions de travail adoptées alors, que nous savons aujourd'hui être défectueuses.

TABLEAU XII.

Origine de la Pse	KM (Ar)	KM (log)
pH 9,22		
Intestin.....	2.000	
Rein.....	2.800	
Foie.....	2.600	
Sérum.....	2.500	
pH 9,30		
Intestin.....	1.700	1.450
Rein.....	2.400	
Foie.....	1.900	1.600 à 1.800
Sérum.....	1.900	1.700
pH 9,60		
Intestin.....		460
Rein.....		850
Foie.....		650
Sérum.....		630

En réalité nos résultats actuels montrent que la phosphatase sérique alcaline est une, et en particulier que dans les hyperphosphatasémies sa nature ne dépend pas de l'origine. Aussi doit-il être possible par comparaison avec les courbes établies pour les phosphatases de divers organes, de déterminer la nature de la phosphatase sérique.

Le tableau XII permet de comparer la valeur de KM de phosphatase du sérum et des organes. La constante d'affinité des phosphatases des organes a été déterminée d'après les courbes de la figure 6.

La phosphatase du sérum humain présente une affinité nettement différente de celle du rein et de l'intestin de chien, mais, par contre, pratiquement identique à celle du foie de chien.

2. — Sérum de chien normal.

Les conditions d'expérience ont été les mêmes que pour le sérum humain.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

pH 9,22	K.M. (Ar)	2.500	2.500	2.600
pH 9,60	K.M. (log)	800		
	K.M.	700	650	640

L'affinité des phosphatases du sérum et de celle du foie sont du même ordre de grandeur.

De plus, il existe un très léger écart entre KM du sérum humain et canin à pH 9,60. Cet écart n'est pourtant pas très en-dessus de la marge d'erreur. S'il soulève le problème de légères différences entre les phosphatases selon l'espèce animale, il ne permet donc pas de le résoudre. Cependant il est évident que si ces différences existent elles sont très minimes.

3. — Sérum de chien ictérique.

Nous avons sur deux chiens pratiqué une ligature du choledoque aseptique au fil de nylon. La voie biliaire a été sectionnée en-dessous de la ligature pour éviter le

rétablissement de la continuité biliaire, si fréquent chez cet animal.

Expérience 1 : chien de 12 kg. Ligature du choledoque.
 — sang prélevé avant ligature S.1.
 — sang prélevé 48 h. après ligature S.2.
 sang prélevé 72 h. après ligature S.3.

TABLEAU XIII.
 pH 9.60 — chien 1.

N° du sérum	Activité	KM (log)
1	19	650
2	160	690
3	280	640

Expérience 2. — Chienne 10 kilog.
 S.1. — sang avant ligature.
 S.2. — sang prélevé 19 heures après ligature.

TABLEAU XIV.
 pH 9,22 — chien 2.

N° du sérum	Activité	KM (log)
1	25	2.500
2	60	2.600

4. — Etudes de mélanges de sérum et de phosphatases de divers organes.

Le sérum étant un milieu beaucoup plus complexe que les extraits purifiés d'organes, nous avons voulu nous rendre compte s'il ne modifiait pas l'affinité des phosphatases tissulaires et si l'identité foie-sérum se retrouvait en milieu sérique. Nos expériences ont été conduites de la manière suivante : nous avons préparé

deux séries identiques de tubes contenant comme pour les essais précédents des concentrations variées de β glycérophosphate de soude. L'hydrolyse est faite dans la première série de tube par le sérum pur, dans la deuxième série par le même sérum auquel on a ajouté un extrait enzymatique d'intestin ou de foie. Ces extraits étant très actifs il suffit d'ajouter à 10 cm³ de sérum 0,02 à 0,1 cm³ de phosphatase purifiée, par conséquent, exception faite de l'activité phosphatasique différente, les conditions expérimentales sont identiques dans les deux séries. L'hydrolyse dure de 5 à 10 minutes, ce qui permet d'avoir pour le sérum seul une activité très faible que l'on soustrait pour chaque concentration de β gly-

TABLEAU XV.

Exemple de calcul de la constante d'affinité du mélange foie - sérum à divers pH.

β Glyceroph. M	Activité en γ de P		
	pH 9,21	pH 9,30	pH 9,60
0,00025	5,5		
0,00030			
0,00040	7,5	9,5	8
0,00060	9,5	11	8
0,00080	10,5	13	11
0,00120	11,5	15,5	16
0,00160	15	17	21
0,00250	16	18,5	24
0,00400	16,5	20	27,5
0,00800	16,75	21,75	32
0,0120		22	33
0,0160		22	33
0,02			33

cérophosphate de l'activité du mélange sérum-enzyme. Les quantités de P. libéré par l'enzyme sérique étant très faibles (1 à 5 γ pour la plus forte concentration) elles ne peuvent perturber la cinétique de l'hydrolyse par l'enzyme tissulaire.

TABLEAU XVI.

Constante d'affinité des phosphatases d'intestin et de foie en présence de sérum.

	pH. 9,21	pH. 9,30	pH. 9,60
KM (Ar) I....	2.100	1.750	
KM (log) I....			470
KM (Ar) IS....	1,500—1.530	1.350	500
KM (log) Is...			355—260—300
KM (Ar) F....	2.500	1.900	
KM (log) F....			650
KM (Ar) Fs...	2.500	1.850	
KM (log) Fs...			770—650
KM (Ar) S....	2.500	1.900	1.000
KM (log) S....			700—650

I = intestin.

Is = intestin dans du sérum.

F = foie.

Fs = foie dans du sérum.

S = sérum.

La comparaison de l'affinité en milieu véronal sodique - magnésium et en milieu véronal sodique - magnésium - sérum montre que l'action du sérum est très différente selon que l'enzyme utilisé est le foie ou l'intestin.

a) *Cas du foie.* — Le tableau XVI permet de constater l'identité de KM pour le foie tamponné par du véronal sodique, le foie en milieu sérum + véronal sodique et le sérum dans du véronal sodique. Ceci est donc un argument de plus en faveur de l'identité de la phosphatase sérique et hépatique.

b) *Cas de l'intestin.* — On peut, au contraire, constater que l'affinité de la phosphatase intestinale non seulement ne rejoint pas celle de la phosphatase sérique, mais qu'elle s'en éloigne plus encore qu'en présence de véronal sans sérum.

Ces constatations nous permettent les conclusions suivantes :

1°) La notion de spécificité tissulaire des phosphatases est renforcée par nos observations qui rendent bien improbable l'hypothèse que les différences d'affinité puissent être dues à la présence d'effecteurs.

2°) L'identité des enzymes hépatique et sérique doit être tenue pour démontrée.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE III.

A. — Envisagée du point de vue de la constante d'affinité, la phosphomonoestérase alcaline sérique normale et pathologiquement ou expérimentalement élevée paraît être un enzyme unique.

B. — La phosphatase sérique est probablement identique à celle du foie et différente de celle de l'intestin.

CHAPITRE IV.

ORIGINE ET ÉLIMINATION DE LA PHOSPHATASE DE SÉRUM.

L'identité de la phosphatase sérique et hépatique peut être considérée comme démontrée à la suite des expériences que nous avons exposées au Chapitre III. Cette identité ne permet cependant pas de conclure que le foie secrète dans le sang sa propre phosphatase. Cette proposition est d'ailleurs bien improbable depuis les travaux de DALGAARD. Il est donc possible de suggérer l'hypothèse inverse : le foie ne collecte-t-il pas une phosphatase sérique secrétée par d'autres organes.

Nous avons essayé de résoudre ce problème par les expériences suivantes.

1. — Injection au chien de phosphatase intestinale purifiée.

L'expérimentation physiologique dont les résultats ont été analysés dans la première partie de ce travail a paru montrer que l'intestin et l'os déversent, tout au moins dans certaines circonstances, leurs phosphatases dans le plasma. Nous avons essayé de provoquer artificiellement, par injection intraveineuse d'un de ces enzymes, une hyperphosphatasémie, de manière à étudier les valeurs de KM dans le plasma ainsi rendu artificiellement hyperphosphatasémique. La phosphatase osseuse

du fœtus (la plus facile à obtenir) s'étant révélée hétérogène, nous avons choisi pour ces expériences l'extrait ALBERS de phosphatase intestinale de chien, qui, très actif, permet d'obtenir une hyperphosphatasémie très élevée lorsqu'on l'injecte en faible quantité. L'injection est souvent suivie d'un choc, mais celui-ci a généralement été sans gravité et l'animal a pu être utilisé dans les heures suivantes à d'autres fins.

Le protocole expérimental est le suivant : l'animal est attaché sur la table sans anesthésie. Les ponctions se font si possible dans le saphène, sinon dans l'artère fémorale. Une fois même nous avons utilisé sans incident la ponction thoracique du cœur. La quantité de phosphatase injectée a varié de l'extrait de 1/3 à 1/6 d'un intestin de chien. La quantité proportionnelle au poids a été à peu près identique pour chaque animal, elle représente environ 100 fois la phosphatasémie totale de l'animal. Le pH était identique pour les diverses mesures d'une même expérience, mais il était différent d'une expérience à l'autre (9,4 à 9,9). L'activité phosphatasique a été mesurée en unités arbitraires représentant la valeur de l'activité avant injection.

TABLEAU XVII.

Expérience 1 : jeune mâle 13,5 kg (péritoine ouvert pour une expérimentation physiologique durant depuis 3 heures).

Temps de prélèvement en minutes T	Activité (A)	KM (log)
0	1	210
4	17,5	160
25	1,4	200
72	1	190

TABLEAU XVIII.

Expérience 2 : femelle 8 kgs — choc de la 5^e à la 12^e minute.

T	A	KM (Ar)
0	1	1.300
7	6,35	1.300
32	5,45	1.300

TABLEAU XIX.

Expérience 3 : mâle âgé 9 kgs — pas de choc.

T	A	KM (Ar)
0	1	850
7	4,0	850
35	3,5	800

TABLEAU XX.

Expérience 4 : même animal que pour l'expérience 3 — choc important.

T	A	KM (Ar)
0	1	950
7	4,5	1.050
35	1	950

TABLEAU XXI.

Expérience 5 : chien mâle 8 kgs — choc.

T	A	KM (Ar)
0	1	1.500
15	1	1.500

TABLEAU XXII.

Expérience 6 : chienne 8,5 kgs subictérique (ictère par hépatite) — choc.

T	A	KM (log)
0	1	420
1	78	420
10	10,7	420

a) La première conclusion que l'on peut tirer de ces expériences est l'identité de la constante d'affinité de la phosphatase dans le sérum normal et dans l'hyperphosphatasémie pratiquée par injection intraveineuse de phosphatase intestinale. Ce fait est d'autant plus surprenant que nous avons montré au Chapitre III que la phosphatase osseuse avait une affinité très différente de celle du sérum, en particulier quand elle hydrolysait le β glycérophosphate dans ce dernier milieu. Il faut donc admettre que l'enzyme intestinal subit dans l'organisme une modification de sa structure. Il ne s'agit en effet certainement pas de l'action d'un effecteur puisque l'enzyme *in vitro* n'est pas modifié par le sérum ce dernier milieu étant évidemment semblable *in vitro* et *in vivo*. Cette transformation doit d'ailleurs être rapide puisqu'il n'a pas été possible de constater de baisse importante après injection. Tout au plus dans l'expérience 1, à la quatrième minute KM est-il un peu abaissé (160 contre 190 à 200). Cette expérience est d'ailleurs moins précise que les autres (le pH étant très alcalin, KM est plus difficile à mesurer). D'ailleurs, une minute après l'injection, dans l'expérience 6 malgré une hyperphosphatasémie supérieure de 78 fois à la phosphatasémie de base, l'enzyme injecté a pris le type sérique.

b) Malgré des hyperphosphatasémies considérables, le taux d'enzyme (exception faite de l'expérience 2) re-

tourne très rapidement à la normale, le taux de base ou des valeurs légèrement supérieures étant atteint de la quinzième à la trente-cinquième minute. On peut s'étonner que, malgré des quantités de phosphatase injectées pratiquement identique, le chiffre maximum soit si variable (de 78 à 4,5 unités). Mais il faut remarquer que ce taux est d'autant plus élevé que le premier prélèvement a été fait plus tôt après l'injection. Il est donc probable que le sommet de la courbe a été élevé et antérieur à ce prélèvement dans la plupart des cas. Ceci explique bien l'absence d'élévation de l'expérience 5 et l'anomalie de la courbe de l'expérience 2 (cette dernière présente pourtant un caractère particulier : la faible baisse d'activité de la phosphatasémie à la 35^e minute). Ce caractère n'a pu être relié ni à l'existence d'un choc (existant également dans les expériences 4, 5 et 6, absent dans les expériences 1 et 3) ni à l'influence du sexe (identique dans l'expérience 6). Il semble donc que la plus forte baisse d'activité se produise dans les premières minutes après l'injection.

2. — Injection de phosphatase intestinale au chien après exclusion circulatoire du foie.

La baisse très rapide de l'hyperphosphatasémie d'injection étant comme nous l'avons vu très précoce, il n'est pas nécessaire, pour étudier le rôle du foie d'utiliser des procédés chirurgicaux permettant une survie prolongée. Aussi, avons-nous pratiqué simplement une exclusion circulatoire du foie et de l'intestin par pose d'une ligature sur le pédicule hépatique, les pédicules mésentériques et la veine sus-hépatique. Dans ces conditions, l'animal survivait toujours au moment du dernier prélèvement.

TABLEAU XXIII.

Expérience A : Chienne de 12 kgs.

T	A	KM (Ar)
0	1	950
1,5	72	1,000
5	45	950
12	34	950
20	30	1,050

TABLEAU XXIV.

Expérience B : Chien 9 kgs.

T	A	KM (log)
0	1	500
3	60	500
15	54	500

TABLEAU XXV.

Expérience C : Chien 10 kgs.

T	A	KM (log)
0	1	450
2	65	450
10	47	450
25	45	450

a) L'exclusion du foie et de l'intestin n'entrave nullement la modification de la phosphatase injectée qui prend le type sérique comme dans les expériences pré-

cédentes. Cette transformation ne nécessite donc la participation d'aucun de ces deux organes.

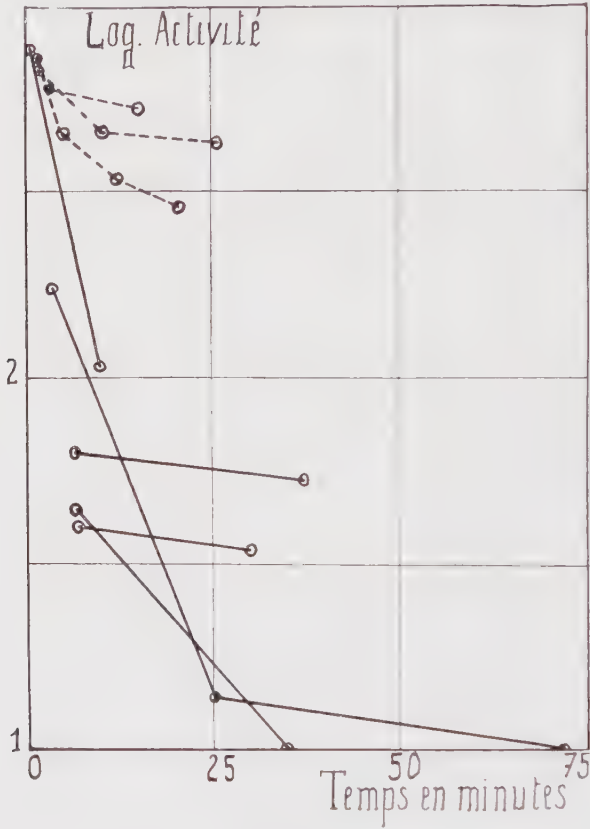


FIGURE 8.

Injection au chien de phosphatase intestinale.
o---o---o psémie du chien à foie exclu.
o—o—o psémie du chien normal.

b) Par rapport aux injections chez le chien normal, la phosphatasémie baisse beaucoup plus lentement après exclusion du foie. Ceci confirme le rôle éliminateur du foie qui ressortait déjà nettement des expériences de DALGAARD. Cependant, il faut remarquer que la phos-

phatasémie diminue malgré tout après avoir immédiatement après l'injection atteint son sommet. Cette diminution paraît être assez rapide dans les premières minutes puis beaucoup plus lente. La première hypothèse que nous avons envisagée pour expliquer ce phénomène est que, à côté du foie, principal organe éliminateur, d'autres tissus (système réticulo endothélial dans son ensemble par exemple) participent à l'élimination de la phosphatase sérique. Cependant, l'aspect des courbes qui, après une chute brusque paraissent tendre vers une asymptote parallèle à l'axe des abscisses et dont l'ordonnée correspond encore à une phosphatasémie très élevée est plutôt en faveur d'un phénomène de diffusion (dans les réservoirs sanguins : foie, rate, capillaires au repos ou dans les liquides intersticiels).

La comparaison des résultats de l'injection chez le chien normal ou après exclusion circulatoire du foie nous permet donc deux conclusions :

1°) Le foie est probablement le seul, ou tout au moins de loin le plus efficace des organes éliminateurs de cette phosphatase artificiellement introduite dans la circulation. On peut en particulier éliminer le rôle du rein qui n'est pas exclu de la circulation dans nos expériences d'éviscération.

2°) La phosphatase intestinale prend immédiatement *in vivo* le type sérique-hépatique alors qu'*in vitro*, le sérum est incapable d'opérer cette transformation. Le rôle du foie est certainement nul dans ce phénomène.

Pourrons-nous généraliser ces conclusions aux hyperphosphatasémies pathologiques ou expérimentales (ligature des voies biliaires). Une objection paraît s'élever contre cette conception. En effet, dans nos expériences, la phosphatase injectée a été purifiée et peut avoir subi des modifications du fait de cette purification. Il nous semble cependant que cette objection peut être levée si l'on considère que la phosphatase intestinale injectée prend immédiatement le type sérique et peut alors être

considérée comme identique à l'enzyme présent dans le sang dans les conditions normales. Il nous semble donc possible de conclure que la phosphatase intestinale et par analogie probablement la phosphatase osseuse prennent après avoir été déversées dans le sang par ces organes le type caractéristique de l'enzyme du sérum et du foie. Dès lors, on conçoit que l'identité des phosphatases sérique et hépatique chez le sujet normal et pathologique ne signifie plus forcément que le foie soit à l'origine de la phosphatasémie. Il est donc possible de ne plus opposer cette constatation à celles de DALGAARD. Tout au contraire, *il est probable que la phosphatase plasmatique sécrétée par divers organes (os, intestin) prend dans la circulation malgré ses caractères d'origine divers, un type unique caractéristique de l'enzyme du sérum. Ce dernier est récupéré par le foie qui avant de le détruire ou de l'excréter le collecte, ce qui explique l'analogie des phosphatases hépatiques et sériques.*

Il nous reste à rechercher le tissu opérant la modification de l'affinité des phosphatases tissulaires. Nous avons pensé, vue la rapidité du phénomène, que les éléments figurés du sang jouaient un rôle et nous avons essayé de le démontrer par les expériences suivantes.

3. — Rôle des cellules sanguines.

Nous avons prélevé au chien normal 80 à 100 cm³ de sang ; un quart de ce sang est défibriné avec des perles de verre de manière à récolter les éléments figurés. Le reste est coagulé puis centrifugé pour l'utilisation du sérum. On étudie alors KM dans les conditions suivantes.

— 1/3 du sérum est mis jusqu'à détermination de KM au bain-marie à 37° (KM — S).

— au deuxième 1/3, on ajoute les globules et une quantité déterminée d'extrait intestinal. On incube 20 minutes à 37°. Une centrifugation permet d'éliminer les éléments figurés, puis on détermine l'affinité (KM — SIG).

TABLEAU XXVI.

Exemple de calcul de la constante d'affinité du mélange
intestin-sérum et intestin sérum globules.

β glyceroph. M	Activité en γ de P		
	H.	S. I.	S. I. G.
0,0008	9,5	14	12
0,0010	11,5	16,5	15
0,0014	14,5	19,75	17
0,0020	17	22	22
0,0030	20	25	26,5
0,0050	22	28	33
0,0080	23,5	31	35
0,0120	23,5	33,5	40
0,0160	23	34	40

S : sérum pur hydrolysé 2 h. 10'.

S.I. : sérum + phosphatase intestinale avec action des
globules — hydrolyse 16 minutes.

S.I.G. : sérum + phosphatase intestinale sans action des
globules — hydrolyse 16 minutes.

— le reste du sérum est complété dans des proportions identiques avec de la phosphatase intestinale mais sans adjonction de globules et mis également à incuber 20 minutes à 37° avant la détermination de KM (SI).

On s'est seulement assuré que le pH était identique dans les trois déterminations sans le mesurer exactement.

KM a été déterminé par la méthode de V. EULER et LAURIN au-dessus de 1.000 et par celle de MICHAELIS et MENTEN au-dessous.

TABLEAU XXVII.
Rôle des globules sanguins sur la phosphatase intestinale.

Expériences	KM S	KM SI	KM SIG
1	900	670	900
2	650	260	700
3	1.000 (KM Ar)	300	1.000 (KM Ar)
4	560	400 (sérum hémolysé)	550
5	660	355	650

Après contact avec les éléments figurés du sang la phosphatase intestinale prend donc le même type d'affinité que celle du sérum. Il paraît difficile que cette modification soit due à un effecteur : il faudrait pour cela admettre que celui-ci passe des globules dans le plasma uniquement quand ce dernier a été mélangé à la phosphatase intestinale purifiée. Il semble donc que *les éléments figurés du sang soient responsables des modifications que subit la phosphatase intestinale dans l'organisme.*

4. — Détermination de l'activité phosphatasique du foie normal et au cours de l'ictère par rétention.

a) *Chez le chien* : nous avons dosé l'activité phosphatasique totale de foie de chien normal et de trois animaux dont le cholédoque avait été lié à pH 9,2 et β glycérophosphate M/50. L'activité est représentée par la quantité de P. libéré par la totalité de l'extrait en 1 minute.

Pour 3 foies normaux, nous avons obtenu les valeurs suivantes :

	1	2	3
Activité totale	4.200	500	700
Activité en γ de P. par mg d'azote et minute (Activité relative)	80	60	

Pour 3 chiens ictériques nous avons obtenu :

Activité totale	20.000	7.000	15.000
Activité relative.....	700		

On voit que la teneur en phosphatase augmente notablement dans le foie du chien après ligature du cholédoque.

b) *Foie de l'homme ictérique ou non.* — Les dosages ont porté sur des fragments prélevés par biopsie peropératoire au bistouri ou par autopsie (prélèvements trois heures après la mort).

Le broyat est autolysé 24 heures dans de l'eau distillée (1 cm³ pour 20 mg). On utilise 2,5 cm³ du filtrat par prise d'essai. Nous avons dosé l'activité phosphatasique par 2,5 cm³, en 2 heures, à pH 9,2 et 5,10, Mg M/250 et glycérophosphate M/50 à 37°.

A = activité à pH 5,10 en γ de P. libérés

B = activité à pH 9,20 en γ de P. libérés.

$$R = \frac{A}{B}$$

P = phosphatasémie alcaline en unité Bodansky.

TABLEAU XXVIII.

Observation	A	B	R	P
Steatose hépatique.....	62	32	0,51	3
Ictère par rétention.....	12	121	10,4	20
Ulcère duodénal	27	27	1	5
Ulcère duodénal	38	15	0,39	6
Ulcère gastrique	100	70	0,7	4
Hépatite éthylique	98	53	0,54	4
Ictère par rétention.....	60	132	2,2	14
Ictère par rétention.....	28	156	5,6	25
Ictère par rétention.....	52	152	3	31

Bien que peu nombreux et forcément peu précis, ces

résultats confirment l'importante augmentation de la phosphatase alcaline au cours des ictères par rétention parallèlement à l'hyperphosphatasémie. Ils ne permettent pourtant pas à eux seuls de choisir entre la théorie de l'hyperphosphatasémie par hypersécrétion hépatique ou celle de l'accumulation au niveau du foie d'une phosphatase que cet organe ne suffit plus à détruire ou à excréter.

5. — La phosphatase hépatique après perfusion du foie.

Dans le but d'obtenir un extrait hépatique pur de tout élément plasmatique, nous avons au cours de quel-

TABLEAU XXIX.

Exemple de calcul de la constante d'affinité du foie lavé par perfusion de sérum physiologique.

Glyceroph. M	Activité en γ de P		
	9,48	9,70	9,56
0,0004	7	8	
0,0006	10	10	16
0,0008	11,5	12,5	18
0,0010	13	14	20
0,0014	15,5	16	24
0,0022	19	19	28,5
0,0032	21,5	22	32
0,0040	23,5	23,5	34
0,0050	24	25	36,5
0,0070	28	27,5	40
0,010	31	30	44
0,016	33,5	32,5	49
0,02			51

ques expériences perfusé l'organe au sérum physiologique avant de le broyer. Les extraits ainsi obtenus se sont révélés très différents de l'extrait hépatique préparé sans lavage pour les valeurs de KM.

TABLEAU XXX.

Constante d'affinité de la phosphatase de foie perfusé.

N° de l'extrait	Date	pH	KM (log)
F. a.	14.2.50	9,15	670
F. b.	9.5.50	9,21	562
F. a.	9.3.50	9,22	1050
F. b.	5.5.50	9,48	210
F. b.	8.5.50	9,48	166
F. b.	2.5.50	9,50	280
F. a.	13.2.50	9,51	240
F. a.	2.5.50	9,55	222
F. a.	7.4.50	9,56	275
F. a.	8.4.50	9,64	215
F. a.	10.3.50	9,70	180
F. a.	18.4.50	9,70	147
F. a.	21.4.50	9,70	120

a) Ces extraits présentent plusieurs caractéristiques. D'abord ils sont très peu actifs (10 à 20 fois moins actifs que les extraits d'organe non perfusé) et leur activité diminue très rapidement, nécessitant des temps d'hydrolyse de plus en plus prolongés.

b) De plus, leur affinité est très faible et variable, s'abaissant progressivement malgré leur conservation à la glacière. On peut juger cet abaissement d'après les dates d'expériences à pH 9.48 pour F.b. et à pH 9.70 pour F.a. (ces variations peuvent être dues à une erreur dans

la mesure du pH, chaque mesure ayant été couplée avec une détermination de l'affinité de la phosphatase intestinale dont la valeur correspondait chaque fois aux erreurs d'expérience près à celle qui peut être calculée d'après la courbe qu nous avons donnée. Ces valeurs n'ont pas été indiquées pour ne pas surcharger le tableau).

La constatation de ces valeurs basses et décroissant dans le temps, nous a fait penser que le produit étudié était un enzyme instable, en cours de destruction. Le fait est d'autant plus particulier qu'au cours d'expériences antérieures, nous n'avions trouvé aucune variation de l'activité phosphatasique du rein que cet organe ait été traité après ou sans perfusion au sérum physiologique.

Cette phosphatase en cours de destruction ne peut provenir que de l'enzyme hépatique ou de l'enzyme sérique que le foie, comme nous l'avons vu pouvait collecter avant de l'éliminer.

Si nous confrontons les notions expérimentales suivantes, il nous paraît possible de fournir une solution satisfaisante au problème de la phosphatasémie.

a) L'hépatectomie (DALLGARD) est suivie d'une élévation de la phosphatasémie comme la ligature des voies biliaires.

b) L'enzyme sérique paraît identique à l'enzyme hépatique (identité de KM).

c) Au cours des hyperphosphatasémies par perfusion du sérum d'animal ictérique, le chien ne paraît pas éliminer plus de phosphatase par sa bile qu'avant la perfusion [31] et [202].

d) Le foie perfusé se vide de sa phosphatase normale et ne renferme plus qu'une faible quantité d'un enzyme instable correspondant très probablement à une phosphatase en cours de destruction.

Il semble donc que le foie collecte la phosphatase sérique qui représente alors sinon la totalité tout au moins

une grande partie de son activité phosphatasique propre.

Secondairement cet organe détruit l'enzyme plutôt qu'il ne l'excrète par la bile, la phosphatase biliaire n'ayant probablement aucun rapport avec celle du sang. De plus la facilité avec laquelle la phosphatase hépatique est entraînée par la perfusion du sérum nous fait penser que le foie remet peut-être en circulation une partie de l'enzyme dans certaines circonstances.

6. — **Activité phosphatasique du sang sus et sous hépatique.**

Des résultats très divergents, selon la conception qu'avaient du rôle du foie les divers auteurs, ont été fournis quant à la comparaison de l'activité phosphatasique portale et sus-hépatique. Nos déterminations ont été pratiquées sur des chiens anesthésiés au chloralose, à la fin de diverses expériences pharmacodynamiques. Le sang portal a été prélevé dans le tronc de la veine porte, le sang sus-hépatique dans la partie supérieure de la veine cave inférieure après ligature de celle-ci juste en-dessous des veines sus-hépatiques. Le sang de la grande circulation dans l'aorte abdominale. Sur quatre animaux nous avons obtenu les valeurs suivantes : (activité en γ de P. libéré par 0,5 cm³ de sang en 30 minutes à 37° — SO⁴Mg M/250).

TABLEAU XXXI.

Comparaison de l'activité phosphatasique
du sang de divers territoires.

Chien	Sang porte	Sang sus hep.	sang aortique
1	20	21	20
2	25	25	25
3	18	18	18,5
4	27	26	26

L'activité phosphatasique du sang porte, sus-hépatique et aortique est donc identique dans les conditions expérimentales utilisées (Animal endormi, à jeun depuis plusieurs heures). Ceci ne permet pourtant d'affirmer, ni qu'il n'existe pas de différences minimales trop faibles pour être mesurées, ni que dans des conditions physiologiques différentes (repas gras) de telles différences ne puissent être mises en évidence.

7. — Remarque technique.

Il paraissait satisfaisant pour certaines des expériences de ce chapitre (action des globules sur la phosphatase intestinale, prélèvements répétés de sang après injection d'enzyme) d'utiliser soit l'héparine en injection intraveineuse soit le dicoumarol par la bouche pour rendre le sang incoagulable. Ces procédés doivent être évités. En effet :

a) chez un chien qui avait ingéré du dicoumarol (et avait été injecté avec du lysozyme purifié) nous avons trouvé à pH 9.60 : $KM = 425$ (normalement 650 à 700). Mais, fait plus curieux, pour le mélange de sérum de phosphatase intestinale et le même mélange après action de globules (Cf. chapitre IV § 3) nous avons trouvé une valeur identique pour $KM : 425$.

De même, du sérum prélevé sur animal normal, additionné de poudre de dicoumarol, centrifugé, puis additionné de phosphatase intestinale nous a donné avec ou sans action de globule une constante d'affinité identique dans les deux cas de 360 à pH 9.60.

Il semble donc que le dicoumarol se comporte comme un inhibiteur concurrent et entrave l'action des globules sur la phosphatase intestinale.

b) Pour un plasma préparé par centrifugation d'un sang prélevé sur héparine, nous avons trouvé $KM = 200$ (pH 9.60), alors que sans héparine la valeur de KM était de 620.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE IV.

La phosphatase intestinale injectée au chien est très rapidement éliminée du plasma. Après exclusion circulatoire du foie, l'enzyme injecté paraît diffuser dans l'organisme puis son taux se stabilise pour une activité phosphatasique très élevée. Comme le foie contient après perfusion une faible quantité d'un enzyme très instable, nous pensons que cet organe détruit la phosphatase sanguine plutôt qu'il ne l'excrète.

Les éléments figurés du sang transforment la phosphatase intestinale en phosphatase de type sérique-hépatique. Il s'agit vraisemblablement d'une modification de la constitution de l'enzyme et non de l'action d'un effecteur.

Le foie, au cours de l'ictère par rétention expérimentale et pathologique contient des quantités de phosphatases très supérieures à celles du foie normal.

Ces données, confrontées avec la bibliographie analysée à la première partie de ce travail nous permettent d'interpréter la phosphatasémie de la manière suivante :

Divers organes (os, intestin) déversent dans le plasma la phosphomonoestérase alcaline de leurs cellules. Cet enzyme est immédiatement modifié par les éléments figurés du sang et prend alors un type unique, particulier au sérum et au foie et caractérisé par son affinité. La phosphatase sérique est récupérée par le foie et constitue sinon la totalité du moins une part importante de l'enzyme de cet organe qui va la détruire dans ses cellules. Il est possible cependant qu'avant sa destruction, une partie de la phosphatase puisse être remise en circulation par le foie.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Le but de ce travail a été d'étudier la spécificité tissulaire de la phosphomonoestérase « alcaline » et de préciser l'origine et la nature de la phosphatasémie alcaline. L'analyse de la bibliographie permet, nous l'avons vu de penser que la constante de MICHAËLIS (ou son inverse, la constante d'affinité) représente une valeur plus spécifique que l'action des effecteurs ou le pH optimum. Il ressort cependant des travaux antérieurs que de nombreux facteurs sont susceptibles de modifier l'affinité.

Nous avons donc, dans un premier chapitre fait une étude précise de la cinétique de la phosphatase intestinale. La constante d'affinité varie dans des limites très étendues avec le pH, KM étant d'autant plus bas que le pH est plus alcalin (de 14.000 à pH 8.23 à 130 à pH 9.92). La courbe KM f (pH) présente peut-être une asymptote horizontale vers les pH neutres et vers les pH alcalins. De plus, elle présente aux pH 9.30 et 9.60, deux inflexions qui traduisent probablement la participation de groupements basiques de la protéine enzymatique à la fixation du substrat.

La formation d'un complexe ES_2 paraît exister quel que soit le pH, aussi la détermination de KM par la méthode de MICHAËLIS et MENTEN (inscription logarithmique des concentrations en substrat) donne-t-elle des valeurs plus faibles et plus exactes que par la méthode de VON EULER et LAURIN. Cependant la formation du complexe ES_2 (K_2) est régie par le pH de manière aussi stricte que KM, aussi les valeurs données par cette deuxième technique, si elles ne correspondent pas exactement à la constante de dissociation du complexe ES,

sont-elles pourtant caractéristiques de l'enzyme au même titre que KM.

Le magnésium diminue l'affinité bien qu'il augmente l'activité. Cette action est d'autant plus importante que le pH est plus alcalin.

Les protéines sériques entraînent également une importante diminution de l'affinité de l'enzyme intestinal.

Enfin, tout au moins à partir d'un certain degré de purification (extrait ALBERS) les fractionnements successifs ne modifient pas l'affinité. Il en est de même pour le vieillissement prolongé de l'enzyme (un an à 3°).

Ces divers facteurs de variation de l'affinité peuvent être éliminés par des expériences précises et il devient donc possible dans ces conditions de conclure des différences d'affinités de deux enzymes de provenance différente à leur spécificité.

Nous avons ensuite étudié à divers pH le KM des phosphatases du foie, du rein et de l'intestin de chien adulte pour les comparer entre elles. Pour un même pH, ces valeurs sont constantes pour un même enzyme et différentes pour les phosphatases des divers tissus. Il semble donc que l'on puisse admettre la spécificité tissulaire des phosphomonoestérases alcalines.

La phosphatase des os de fœtus présente par contre aussi bien chez le chien que chez l'homme des valeurs variables d'un fœtus à l'autre. L'affinité est d'autant plus élevée que la date du terme est plus éloignée et l'on peut penser que l'os de fœtus contient deux phosphatases alcalines, la première apparaît très tôt au cours de l'évolution et présente une affinité très élevée. La seconde apparaît plus tard et tend à remplacer progressivement la première, de plus son affinité est beaucoup plus basse.

La phosphatase du sérum normal ou hyperphosphatémique (hyperphosphatasémies osseuses pathologiques, hyperphosphatasémies hépatiques pathologiques et expérimentales) chez le chien et chez l'homme présente pour un même pH, un KM constant et indépendant de son activité. De très légères différences entre les valeurs obtenues

chez l'homme et le chien permettent de soulever le problème de la spécificité des enzymes selon l'espèce chez les mammifères, mais elles sont trop proches des erreurs d'expériences pour le résoudre. De plus, l'affinité de l'enzyme sérique est identique à celle de l'enzyme hépatique. Pour éliminer les erreurs dues aux protéines du sérum, nous avons étudié le KM des phosphatases intestinales et hépatiques agissant en milieu sérique (mélange véronal sodique — sérum identique à celui qui a été utilisé pour déterminer l'affinité de la phosphatase sérique) : le sérum diminue l'affinité de la phosphatase intestinale mais ne modifie pas celle de la phosphatase hépatique. On peut donc admettre l'identité des phosphatases sériques et hépatiques. Ceci ne signifie pas forcément que le foie sécrète la phosphatase plasmatique, hypothèse d'ailleurs en désaccord avec les travaux de DALGAARD, mais aussi bien que cet organe collecte une phosphatase plasmatique sécrétée par d'autres organes. Nous avons essayé de résoudre cette question par des expériences d'injection au chien de phosphatase intestinale purifiée. Dans ces conditions, on constate qu'après une hyperphosphatasémie très élevée, l'enzyme sérique retrouve un taux normal 15 à 35 minutes après l'injection. De plus, la phosphatase intestinale injectée prend immédiatement *in vivo* une affinité semblable à celle du sérum. Après exclusion circulatoire du foie et de l'intestin et injection de phosphatase hépatique, on constate que l'enzyme injecté prend bien immédiatement l'affinité de celui du sérum mais l'hyperphosphatasémie se maintient très élevée.

Ceci confirme que le foie élimine la phosphatase à l'exclusion d'autres organes et en particulier du rein. Par contre cet organe n'intervient pas dans la transformation de la phosphatase intestinale en phosphatase sérique. Des expériences de mélange de l'enzyme intestinal avec du sérum et avec des éléments figurés du sang nous ont montré que ces derniers étaient responsables de cette transformation.

Les dosages de phosphatases pratiqués sur des tissus hépatiques chez le chien où l'homme normal et hyperphosphatasémique montrent que dans cette dernière alternative le foie contient une beaucoup plus grande quantité d'enzyme que dans la première. Ceci peut être interprété aussi bien en faveur de l'hypersécrétion hépatique que de la rétention. Par contre après lavage du foie par perfusion de sérum physiologique, l'organe ne contient plus qu'une faible quantité d'un enzyme d'activité et d'affinité décroissante. Il s'agit donc probablement d'une phosphatase instable en cours de destruction.

Enfin, la comparaison de l'activité phosphatasique du sang portal, sus hépatique et aortique chez l'animal à jeûn ne montre aucune différence.

Ces expériences confrontées avec les expériences d'hépatectomie de ARMSTRONG et BANTING et de DALGARDA, ou de transfusion de sang ictérique de CANTAROW et MULLER et de WANG et GROSSMAN nous permettent de proposer la conception suivante du mécanisme de la phosphatasémie.

Divers organes (intestin, os en particulier) sécrètent dans le sang des phosphatases différentes et spécifiques de leur tissu d'origine. Celles-ci sont immédiatement transformées par les éléments figurés du sang en un enzyme unique d'affinité particulière. Le foie collecte la phosphatase sérique, la plus grande part de l'enzyme hépatique étant même d'origine plasmatique, ce qui explique l'identité du KM des phosphatases hépatiques et sériques. Enfin, cet organe détruit la phosphatase plutôt qu'il ne l'excrète par la bile.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABDUL-FAHL (M.) et KING (E. J.). — *J. Clin. Pathol.*, 1948, **1**, 80.
2. AEBI (H.). — *Helv. Chim. Acta*, 1949, **32**, 464 et 2273.
3. ALBERS (H.) et ALBERS (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **232**, 165.
4. ALBERS (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1940, **265**, 129.
5. ALESSANDRIA (E. d'). — *Fol. med.*, 1942, **28**, 453.
6. ALLCROFT (W. M.) et FOLLEY (S. J.). — *Biochem.*, 1941, **35**, 254.
7. ARCURI (F.). — *Arch. Fisiopath.*, 1942, **10**, 173.
8. ARCURI (F.) et FILIPPON (S.). — *Ormoni*, 1941, **3**, 399.
9. ARMSTRONG (A. R.), KING (E. T.) et HARRIS (R. L.). — *Med. Ana. J.*, 1934, **31**, 14.
10. ARMSTRONG (A. R.) et BANTING (F. G.). — *Canad. Med. Ana.*, 1935, **33**, 243.
11. AUSTONI (B.) et COGGI (G.). — *Press. Med.*, 1934, **42**, 709 et 1594.
12. BACCARI (V.) et AURICCHIO (G.). — *Bull. Sa. Ital. biol. sper.*, 1947, **23**, 1168.
13. BAMANN (E.). — *Naturwissenschaftler*, 1940, **28**, 142.
14. BARTOLOMUCCI (E.). — *Sperimenta*, 1940, **94**, 573.
15. BAUER (A.). — *Acta chir. Scand*, 1950, **100**, 228.
16. BAUR (H.). — *Ztschr. f. vit. Horm. u. Ferm.*, 1948-49, **2**, 507.
17. BECHGAARD (P.). — *Acta Med. Scand.*, 1943, **114**, 293.
18. BELFANTI (G.), CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1491.
19. BODANSKY (A.) et JAFFE (H. L.). — *Proc. soc. exper. biol.*, 1931, **28**, 199 et 1933 34, **31**, 107 et 1179.
20. BODANSKY (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 473 et 717.
21. BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1930, **89**, 249 ; 1937, **118**, 341 et 1946, **165**, 605.
22. BONELLI (M.) et GALA (G.). — *Arch. int. pharmac.*, 1949, **80**, 457.
23. BRAUNSTEIN (A. F.). — *Biochem. Ztschr*, 1934, **272**, 21.
24. BUCH (H.). — *Diss. Copenhagen*, 1942.
25. BUCHWALD (K. W.) et HUDSON (L.). — *Endocrinology*, 1944, **35**, 73.
26. BURGEN (A. S.). — *Lancet*, 1947, **252**, 329.
27. CAIN (J. E.), UNDLAY (J. H.), BOLLMANN (J. L.), FLOCK (E. V.) et MANN (F. C.). — *Sur. Gyn. et Obst.*, 1947, **85**, 559.

28. CANTAROW (A.), STEWARD (H.) et Mc COOL (S.). — *Proc. Sa. exper. Biol. a. Med.*, 1936, **35**, 87.
29. CANTAROW (A.). — *Internat. clin.*, 1936/I, **1**, 230.
30. CANTAROW (A.). — *Am. J. Clin. Path.*, 1940, **10**, 858.
31. CANTAROW (A.) et MILLER (L. L.). — *Am. J. Physiol.*, 1948, **153**, 444.
32. CANTOR (M. M.), TUBA (J.) et CAPSEY (P. A.). — *Science*, 1947, **105**, 476.
33. CAPUTTO (R.). — *Rev. Soc. Argentina Biol.*, 1944, **20**, 398.
34. LARR (J. L.) et FOOTE (F. S.). — *Arch. Sc.*, 1944, **49**, 44.
35. CARTIER (P.) et SIMONART (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 393.
36. CAYLA (J.) et FABRE (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 748.
37. CEDRANGOLO (F.). — *Ath. accad. Italica*, 1941, **3**, 99.
38. CERA (B.). — *Rev. Clin. pediat.*, 1941, **39**, 97.
39. CHITRE (R. G.) et PAI (M. L.). — *Indian med. gaz.*, 1948, **83**, 29.
40. CHOLLET (M. M.). — *C. R.*, 1949, **228**, 425.
41. CINELLI (A. P.). — *Rev. Sc. argentina biol.*, 1942, **18**, 53.
42. CLEMO (G. R.) et FELTON (D. G.). — *J. Chem. Sa.*, 1949, **1535**.
43. CLOETENS (R.). — *Enzymologia*, 1939, **6**, 46.
44. CLOETENS (R.). — *Biochem. Z.*, 1941, **307**, 352 ; 1941, **308**, 37 et 1941, **310**, 42.
45. CORYN (G.). — *J. Chir. (belge)*, 1934, **33**, 213.
46. COURTOIS (T.). — Thèse doct. Sc. phys., Paris, 1938.
47. CURTILLO (F.). — *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 1944, **19**, 175.
48. DALGAARD (J. B.). — *Acta physiol. Scand.*, 1947, **12**, 310 ; 1948, **15**, 290 ; 1949 (a), **16**, 287 ; 1949 (b), **16**, 293 ; 1949 (c), **16**, 308 ; 1949 (d), **16**, 318.
49. DAY (H. G.) et FOLLIS (R. H.). — *Endocrinology*, 1944, **28**, 83.
50. DELORY (G. E.) et KING (E. J.). — *Biochem. J.*, 1943, **37**, 547.
51. DELORY (G. E.) et KING (E. J.). — *Biochem. J.*, 1944, **38**, 50.
52. DE VRIES (A.), MILWIDSKY (H.) et RABINOVICCI (N.). — *Acta Med. orient.*, 1947, **6**, 156.
53. DIKSHIT (P. K.) et PATWARDHAN (V. W.). — *Indian J. Med. Res.*, 1947, **35**, 91.
54. DRILL (V. A.), ANNEGERS (J. A.), SNAPP (F. F.) et IVY (A. C.). — *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 97.
55. DRILL (V. A.), BOYD (C.) et SHAFFER. — *Gastroenterology*, 1943, **1**, 308.
56. DRILL (V. A.) et IVY (A. C.). — *J. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 209.
57. DRILL (V. A.) et RIGGS (D. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 23.
58. DUDLER (W.). — *Diss Bane*, 1942.

59. DUMPSEY (E. W.) et DEAN (H. N.). — *J. Cellular. Comp. Physiol.*, 1946, **27**, 159.
60. DUVOIR (M.), LAYANI (F.) et PAUTRAT (T.). — *Bull. et Mem. Soc. Med. Hop. Paris*, 1935, **51**, 1602.
61. ELTON (N. W.). — *J. Lab. a. clin. med.*, 1933, **17**, 1.
62. ERDTMANN (H.). — Cité d'après FOLLEY et KAY.
63. EULER (H. von) et LAURIN (L.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1920, **110**, 55.
64. FLOCK (E. V.) et BOLLMAN. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **184**, 523 ; 1950, 175, 439.
65. FLOOD (C. A.), GUTMAN (E. B.) et GUTMAN (A. B.). — *Amer. J. Physiol.*, 1937, **120**, 696.
66. FOLLEY (S. J.) et GREENBAUM (A. L.). — *Biochem. J.*, 1946, **40**, 46 ; 1947, **41**, 261.
67. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. B.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 183-7.
68. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. B.). — *Ergebn. d. Enzymforsch. Akad. Verlags. Leipzig.*, 1936, **5**, 378.
69. FREEMAN (S.), CHEN (Y. P.) et IVY (A. C.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, **124**, 79.
70. FUJITA (H.). — *J. Biochem. (Jap.)*, 1939, **30**, 60.
71. GAD (I.). — *Acta Physiol. Scand.*, 1946, **11**, 151 ; 1946, **11**, 160.
72. GENEST (P.) et BERNARD (R.). — *Rev. canad. biol.*, 1946, **5**, 586.
73. GIRIK (V.) et SHOURIE (K. L.). — *Indian J. Med. Res.*, 1939, **27**, 153.
74. GOMORI (G.). — *J. cellul. a. comp. physiol.*, 1941, **17**, 71.
75. GOMORI (G.). — *Am. J. Clin. Path.*, 1946, **16**, 347.
76. GOMORI (G.). — *Biochem. et Biophys. Acta*, 1952, **8**, 162.
77. GONZALEZ-ODDONE (M. V.). — *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1946, **63**, 144.
78. GOODLAN (A. J.), MILLS (G. J.) et SMITH (E. E. B.). — *Biochem.*, 1951 **49**, VI.
79. GOTTFRIED (S. P.), STEINMAN (J. F.) et KRAMER (B.). — *Amer. J. Dis. Children*, 1947, **74**, 283.
80. GOULD (B. S.) et SCHWACHMAN (H.). — *Am. J. Physiol.*, 1942, **135**, 485.
81. GOULD (B. S.). — *Journ. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 365.
82. GOULD (B. S.). — *Arch. Biochem.*, 1944, **3**, 175.
83. GUIMARAES-VILLELA (G.) et MELLO (M. I.). — *M. instr. Oswaldo Cruz*, 1948, **10**, 795 et *Hôpital*, 1949, 509.
84. GUTMAN (A. B.) et JONES (B.). — *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1949, **71**, 572.
85. GUTMAN (A. B.), TYSON (T. L.) et GUTMAN (E. B.). — *Arch. int. méd.*, 1936, **57**, 379.
86. HANGER (F. M.) et GUTMAN (A. B.). — *J. A. M. A.*, 1940, **115**/I, 263.
87. HARD (W. C.) et HAWKINS (R.). — *Anat. Rec.*, 1950, **103**, 395.
88. HEPLER (O. E.), SIMONDS (J. P.) et GURLEY (H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1940, **44**, 221.

89. HERBERT (F. K.). — *Biochem. J.*, 1944, **38**, XXIII ; *Bret. J. exper. Path.*, 1935, **16**, 365 ; *Quart. J. Med.*, 1946, **15**, 221.
90. HERLANT (M.) et TIMIRAS (P. S.). — *Endocrinology*, 1950, **46**, 243.
91. HILL (M.) et WEBBER (J. E.). — *J. Pediatr.*, 1943, **22**, 325.
92. HOFFMEYER (J.), JALLING (V.) et SCHOENHEYDEN (F.). — *Acta Physiol. Scand.*, 1946, **11**, 160.
93. HOLMGREN (P. J.) et SVANBORG (A.). — *Acta Med. Scand.*, 1950, **137**, 187.
94. HOMMERBERG (C.). — *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1929, **185**, 123.
95. HORII et TOMIKAWA. — D'après FOLLEY et KAY.
96. JACOBSEN (E.). — *Biochem. Ztschr.*, 1932, **249**, 21 ; 1933, **267**, 89.
97. JACOBY (F.). — *Nature*, 1946, **158**, 268.
98. JAFFE (H. L.) et BODANSKY (A.). — *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 1943, **19**, 831.
99. JALLING (O.), LAURSEN (T.) et VOLGUARTZ (K.). — *Acta Physiol. Scand.*, 1945, **10**, 70.
100. JEENER (R.). — *Nature*, 1947, **159**, 578.
101. JIMENEZ-DIAZ (C.). — *Lancet*, 1936/II, 1135.
102. JOSEPHSON (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, **134**, 50.
103. KAY (H. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1930, **89**, 235.
104. KING (E. J.) et ARMSTRONG (A. R.). — *Canad. Med. Ass.*, 1934, **31**, 376.
105. KING (E. J.) et DELORY (C. E.). — *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1157.
106. KOCHAKIAN (C. D.) et FOX (R. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 669.
107. KOCHAKIAN (C. D.) et VAIL (V. N.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **156**, 779.
108. KOCHAKIAN (C. D.). — *Am. J. Physiol.*, 1945, **145**, 118.
109. KODAMA (S.) et TAKAMATSU (H.). — *Trav. Soc. path. Jap.*, 1939, **29**, 498.
110. KRITZLER (R. A.) et BEAUBIEN (J.). — *Am. J. Path.*, 1949, **25**, 1079.
111. KUHN (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1923, **125**, 28.
112. KUTSCHER (W.) et WUST (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **273**, 335.
113. LANDAHL (H. D.). — *Bull. Math. Biophys. U.S.A.*, 1950, **2**, 171.
114. LASZT (L.) et VOGEL (H.). — *Nature*, 1946, **158**, 588.
115. LAURENS (A.). — Thèse Pharmacie, Marseille, 1942.
- 115 bis. LAVIALDI (J.). — *Ana. real. acad. farm.*, 1949, **15**, 819.
116. LAWRIE (N. R.) et YODKIN (J.). — *Biochem. J.*, 1949, **45**, 438.
117. LECOQ (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, 421.
118. LEO (F. de). — *Soc. Ital. Biol. sper.*, 1941, **16**, 777.
119. LEVENE et DILLON. — *J. Biol. Chem.*, 1930, **88**, 753.
120. LI (Choh Hao), KALMAN (C.), EVANS (H. M.) et SIMPSON (M. E.). — *J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, 715.

121. LI (C. H.), KALMAN (C.) et EVANS (H. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **169**, 625.
122. LINEWEAVER (H.) et BURK (I.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
123. LOPEZ-NAVARRO (J.). — *Rev. span. fisiol.*,
124. LOW (M. R.) et HUB (W. J.). — *Proc. Soc. exper. Med.*, 1936, **31**, 447.
125. LUCA (G. de). — *Ormoni*, 1940, **2**, 203.
126. MADDOCK (S. G.), SCHMIDT (G.) et THANNHAUSER (S. F.). — *Fed. Proc.*, 1942, **1**, 181.
127. MANDEL (P.), CLAVERT (J.) et MANDEL (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 244.
128. MARTINZO (A.). — *Folia Med. (Naples)*, 1949, **32**, 531.
129. MARTLAND (M.) et ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665 ; 1929, **23**, 237.
130. MASSART (L.) et DUFAIT (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **273**, 157.
131. MATHIES (J. C.), GAEBLER (O. H.) et PALM (L.). — *Endocrinology*, 1949, **45**, 480.
132. MELLOR (C.) et KANEMATSU SUGIARA. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1948, **67**, 242.
133. MENTER (M. L.), JUNGE (J.) et GREEN. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1944, **57**, 82.
134. MICHAELIS (L.) et MENTEN (L.). — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
135. MICHAELIS (L.) et ROTHSTEIN. — *Biochem. Z.*, 1920, **110**, 217.
136. MILLER (L. L.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **172**, 113 ; 1950, **186**, 253.
137. MOELWYN (Hughes E. A.). — In the enzymes — SUMNER (J. B.) et MYRBACK (K.). — Vol. 1, part 1/28.
138. MONCHI (J.), JIMENES-VARGAS (J.) et SOLS (A.). — *Rev. expat. fisiol.*, 1947, **3**, 289.
139. MOOG (F.). — *Biol. Rev. Cambridge, Phil. Soc.*, 1946, **21**, 41.
140. MORRIS (N.) et PEDEN (O. D.). — *Quart. J. Med.*, 1937, **30**, 211.
141. MOTZOK (I.) et WYNNE (A. M.). — *Biochem. J.*, 1950, **47**, 187 ; 1950, **47**, 193.
142. MOYSON (F.). — *Acta gastroent. belg.*, 1951, **14**, 77.
143. MUNEMURA (S.). — *Journ. of Biochem.*, 1933, **17**, 343.
144. NEUMANN (A.). — *Biochem. Biophys. Acta*, 1949, **3**, 117.
145. NOTHMANN (M. M.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1944, **57**, 15.
146. ONO (Kenzo). — *J. Biochem. (Japan)*, 1941, **33**, 35.
147. OPPENHEIMER (M. J.). — *Conf. on liver inj. tra.*, 1946, **5**, 36.
148. OPPENHEIMER (M. J.) et FLOCK (E. V.). — *Am. J. Physiol.*, 1947, **149**, 418.
149. PELOSIO (C.) et FIORE (A.). — *Arch. Sc. Med.*, 1948, **85**, 199.

150. PERKINS (H. R.) et ZILVA (S. S.). — *Biochem. J.*, 1950, **47**, 306.
151. PFANKUCH (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 34.
152. PONZ (F.). — *Rev. Espan. fisiol.*, 1945, **1**, 173.
153. RABATE (J.) et COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 190.
154. ROBERTS (W. M.). — *Brit. J. Expt. Path.*, 1930 **41**, 90 ; *Brit. Med.*, 1933, **1**, 734.
155. ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1923, **17**, 286.
156. ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 734.
157. ROCHE (J.). — *Helv. Chim. Acta*, 1946, **29**, 1253.
158. ROCHE (J.). — The enzymes (SUMMER et MYRBACK), 1950, vol. 1, part 1, p. 471.
159. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LEANDRI (A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314.
160. ROCHE (J.) et COLLET (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1940, **22**, 245.
161. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 166.
162. ROCHE (J.) et SIMONOT (M. T.). — *Enzymologia*, 1942, **10**, 239.
163. ROCHE (J.) et THOAI (N. V.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **14**, 847.
164. ROCHE (J.), THOAI (V. N.) et BAUDOIN (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **29**, 1247.
165. ROCHE (J.), CAROMIGUIERE (S. de) et LAURENS (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 243.
166. ROCHE (J.) et SARLES (H.). — *Bioch. et Bioph. Acta*, 1950, 275.
167. ROCHE (J.) et SARLES (H.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951,
168. ROCHE (J.) et ABDUL-FAHL (A. M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*,
169. ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). — *Exposés annuels Bioch. Med.*, 1943, **4**, 219.
170. ROSS (M. H.), ELY (J. O.) et ASCHER (J. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 561.
171. ROSSI (A.). — *Bull. Soc. Ital. biol. sperim.*, 1933, **8**, 714.
172. ROTHMAN (M. M.), MERANZE (D. R.) et MERANZE (T.). — *Am. J. Med. Sc.*, 1936, **192**, 526.
173. RUSSEL (W. O.), ROUSE (E. T.) et READ (T. A.). — *Arch. Path.*, 1944, **38**, 40.
174. RUSSO (A.). — *Bull. Soc. ital. sperm.*, 1940, **15**, 539.
175. SADANISSIAN (V.). — *Nature*, 1950, **109**, 418.
176. SCIMONI (I.). — *Pathologica* (Gênes), 1939, **31**, 520.
177. SHERLOCK (P. V. S.) et WALSHE (V.). — *J. Path. Bact.*, 1947, **59**, 615.
178. SCHIFFMANN (A.) et WINCKELMANN (L.). — *Arch. int. Med.*, 1939, **63**, 919.
179. SMITH (J.). — *Arch. Di. Childr.*, 1933, **8**, 215.
180. SNYDER (F. H.) et TWEEDIE (W. R.). — *J. Biol. Chim.*, 1942, **146**, 639.

181. SOULAIRAC (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 278 et 645.
182. SOULAIRAC (A.), DESCLAUX (P.) et TEYSSEYRE (Y.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1595.
183. TAKATA (H.). — *J. Bioch. (Japan)*, 1931, **14**, 61.
184. TALBOT (N. B.), HOFFEL (G.), SCHWACHMAN (H.) et TUOHY (E. L.). — *Amer. J. Dis. Child.*, 1941, **62**, 273.
185. TANTURI (C. A.), CANEPA (J. F.), BAY (R.) et BANFI (R. F.). — *Gyn. Ol.*, 1946, **83**, 171.
186. THANNHAUSER (S. J.), REICHEL (M.), GRATTAN (J. F.) et MADDOCK (S. J.). — *J. Biol. Chim.*, 1937, **121**, 697, 709, 715, 721, 727 ; *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1163.
187. THIVOLLE (C.) et THIVOLLE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 514.
188. THOI (N. V.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 521.
189. THOI (N. V.). — Thèse.
190. TISSIERE (A.). — *Acta anat.*, 1948, **5**, 224.
191. TROGANIELLO (A.). — *Folia med.*, 1947, **30**, 251.
192. TUBA (J.), CANTOR (M. M.), SIEMENS (H.) et CAPSEY (P. A.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, **32**, 194.
193. UMENO (M.). — *Biochem. Z.*, 1931, **231**, 346.
194. URAKI. — *J. Biochem. (Jap.)*, 1931, **14**, 1931.
195. VAIL (V. N.) et KOCHAKIAN (C. D.). — *Am. J. Physiol.*, 1947, **150**, 580.
196. VERMEHREN (E.). — *Acta med. Scand.*, 1939, **100**, 244 ; Diss. Copenhague, 1941.
197. VERNE (J.) et HUBERT (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **141**, 300.
198. VINCENTIS (A. de). — *Rev. Path. Sper.*, 1940, **23**, 129.
199. WACHTEL (L. W.), ELVEHJEM (G. A.) et HART (E. W.). — *Amer. J. Phys.*, 1943, **140**, 72.
200. WACHSTEIN (M.) et ZACK (F. G.). — *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1946, **62**, 73 ; *Arch. Path.*, 1946, **42**, 507.
201. WANG (C. C.), GROSSMAN (M. I.) et IVY (A. C.). — *Am. J. Phys.*, 1948, **154**, 358.
202. WANG (C. C.) et GROSSMAN (M. I.). — *Am. J. Physiol.*, 1949, **156**, 256.
203. WEIL (L.) et RUSSELL (M. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1940, **136**, 9 ; 1942, **144**, 307.
204. WHICHER (C. H.) et WATSON (E. M.). — *Endocrinology*, 1943, **33**, 83.
205. WIESE (A.), JOHNSON (B.), ELVEHJEM (C. A.), HART (E. B.) et HALPEN (T.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 411.
206. WIESE (A.), BENHAM (L.), ELVEHJEM (C. A.) et HART (E. B.). — *Poult. Sc.*, 1941, **20**, 255.
207. WILLIAMS (H. L.) et WATSON (E. M.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1941, **26**, 1333 ; *Endocrinology*, 1941, **29**, 250.
208. WOODWARD (H. Q.) et DEAN (A. L.). — *J. Urol.*, 1947, **57**, 158.

TABLE DES MATIÈRES.

PREMIÈRE PARTIE. — *Introduction.*

CHAPITRE I. — Etude biochimique de la spécificité d'organe de la phosphomonoestérase alcaline et phosphatasémie	9
A) Action des effecteurs et spécificité tissulaire..	9
B) Le pH optimum et la spécificité tissulaire	12
C) Etude cinétique de la phosphomonoestérase alcaline	13
Conclusion du Chapitre I	18

CHAPITRE II. — <i>L'origine et la nature de la phosphatase du sérum. Etude physiologique</i>	20
A) La phosphomonoestérase alcaline du sérum..	20
B) Les phosphatases des tissus. Sources et émonctoires possibles de la phosphatasémie	23

DEUXIÈME PARTIE. — *Recherches personnelles.*

TECHNIQUES ANALYTIQUES	45
------------------------------	----

CHAPITRE I. — <i>Etude des variations de KM selon les conditions expérimentales</i>	49
A) Variation en fonction de pH	49
B) Relation de KM et du degré de pureté de la phosphatase	58
C) Relation entre l'affinité et le vieillissement de l'enzyme	59
D) Relation entre l'affinité et la concentration en magnésium	60

CHAPITRE II. — <i>Constante d'affinité de divers organes (foie, intestin, rein, os) et spécificité tissulaire des phosphomonoestérases alcalines</i>	62
A) Foie, rein et intestin	62
B) Constante d'affinité de la phosphatase d'os de fœtus	68

CHAPITRE III. — <i>Etude cinétique du sérum normal et hyperphosphatasémique chez le chien et chez l'homme</i>	73
1. Sérum humain normal et hyperphosphatasémique	74
2. Sérum de chien normal	77
3. Sérum de chien ictérique	77
4. Etude de mélanges de sérum et de phosphatase de divers organes	78
CHAPITRE IV. — <i>Origine et élimination de la phosphatase du sérum</i>	82
1. Injection au chien de phosphatase intestinale purifiée	82
2. Injection de phosphatase intestinale au chien après exclusion circulatoire du foie	86
3. Rôle des cellules sanguines	90
4. Détermination de l'activité phosphatasique du foie normal et au cours de l'ictère par rétention	92
5. La phosphatase hépatique après perfusion du foie	94
6. Activité phosphatasique du sang sus et sous hépatique	97
7. Remarque technique	98
CONCLUSIONS	101
BIBLIOGRAPHIE	105

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

le 11 avril 1953

P. CHOUX.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie d'Aix-Marseille,

J. BLACHE.



Achevé d'imprimer le 22 septembre 1954.

Imprimerie Maurice DECLUME, Lons-le-Saunier. — 536-54-220
Septembre 1954 « Dépôt légal 3^e trimestre 1954 — n^o 4330 ».

